

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **028288**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2017.10.31**

**(21)** Номер заявки  
**201171478**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2010.05.26**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/385* (2006.01)  
*A61K 47/50* (2017.01)  
*A61P 37/04* (2006.01)  
*A61K 39/39* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

**(54) НАНОНОСИТЕЛИ, ИМЕЮЩИЕ КОМПОНЕНТЫ С РАЗЛИЧНЫМИ СКОРОСТЯМИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ**

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

**(32)** 2009.05.27

**(33)** US

**(43)** 2012.06.29

**(86)** PCT/US2010/001559

**(87)** WO 2010/138192 2010.12.02

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

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

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

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

DIWAN M. ET AL.: "Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 85, no. 1-3, 13 December 2002 (2002-12-13), pages 247-262, XP004397783, ISSN: 0168-3659, DOI: DOI:10.1016/S0168-3659(02)00275-4, abstract

WO-A2-2008115319

WO-A1-2010/042870

WO-A1-2009076158

WO-A2-2010003009

WO-A2-2010138193

WO-A2-2010138194

**(57)** Изобретение относится к композициям и связанным с ними способам из синтетических наноносителей, которые включают иммуномодулирующие средства и антигены, которые дифференциально высвобождаются из синтетических наноносителей.

**B1****028288****028288****B1**

### Родственные заявки

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

### Область изобретения

Изобретение относится к композициям и связанным с ними способам из синтетических наноносителей, которые включают иммуномодулирующие средства и антигены, которые дифференциально высвобождаются из синтетических наноносителей.

### Предпосылки

Общепринятые методики вакцинирования включают введение антигенов с адъювантами. Однако отсутствует информация касательно биологического взаимодействия между этими двумя средствами и касательно того, как контроль их доставки может обеспечить оптимальные эффекты *in vivo*. Существует необходимость в новых способах доставки антигенов с адъювантами, которые предусматривают оптимальные эффекты *in vivo*, а также в связанных с ними композициях.

### Краткое описание изобретения

Аспекты изобретения относятся к композициям, содержащим синтетические наноносители, которые включают иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наноносителем, и антиген, связанный с синтетическим наноносителем, при этом иммуномодулирующее средство и антиген отделяются от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$$IA \text{ (высв.)\%/} A \text{ (высв.)\%} \geq 1,2,$$

где  $IA \text{ (высв.)\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму веса иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный в весовом проценте и взятый как среднее образцов синтетических наноносителей, и где  $A \text{ (высв.)\%}$  определяют как вес антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму вес антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес антигена, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный в весовом проценте и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связано с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномодулирующее средство части. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство ковалентно связано с синтетическим наноносителем. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство инкапсулировано в синтетическом наноносителе. В определенных вариантах осуществления антиген связан с синтетическим наноносителем посредством связывающей антиген части. В некоторых вариантах осуществления антиген ковалентно связан с синтетическим наноносителем. В определенных вариантах осуществления антиген инкапсулирован в синтетическом наноносителе.

В некоторых вариантах осуществления антиген является В-клеточным антигеном. В определенных вариантах осуществления В-клеточный антиген является антигеном, происходящим от инфекционного агента. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является слабоиммуногенным антигеном. В определенных вариантах осуществления В-клеточный антиген является злоупотребляемым веществом или его частью или вызывающим привыкание веществом или его частью. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген является токсином или вредным для окружающей среды средством. В определенных вариантах осуществления В-клеточный антиген является аллергеном, антигеном дегенеративного заболевания, раковым антигеном, антигеном атопического заболевания или антигеном заболевания обмена веществ.

В некоторых вариантах осуществления антиген является Т-клеточным антигеном. В определенных вариантах осуществления Т-клеточный антиген является антигеном МНС I класса. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующим средством является адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант включает агонист Toll-подобного рецептора (TLR), такой как агонист TLR 3, агонист TLR 7, агонист TLR 8, агонист TLR 7/8 или агонист TLR 9. В некоторых вариантах осуществления агонистом TLR является имидазохинолином. В определенных вариантах осуществления имидазохинолин представляет собой резиквимод или имиквимод. В некоторых вариантах осуществления агонистом TLR является иммуностимулирующая нуклеиновая кислота, такая как иммуностимулирующая ДНК или иммуностимулирующая РНК. В определенных вариантах осуществления иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой CpG-содержащую иммуномодулирующую нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления адъювант включает универсальный Т-клеточный антиген. В определенных вариантах осуществления синтетические наноносители включают один или несколько биоразлагаемых полимеров. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство свя-

зано с одним или несколькими биоразлагаемыми полимерами посредством связывающей иммуномодулирующей части. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство ковалентно связано с одним или несколькими биоразлагаемыми полимерами. В некоторых вариантах осуществления связывающая иммуномодулирующая часть включает амидную связь. В определенных вариантах осуществления связывающая иммуномодулирующая часть включает сложноэфирную связь. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение включает электростатическую связь.

В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемые полимеры включают поли(лактид), поли(гликолид) или сополимер(лактида и гликолида). В определенных вариантах осуществления биоразлагаемые полимеры имеют средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Да, как определено с помощью гель-проникающей хроматографии. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы дополнительно обладают свойством нацеливания на антигенпрезентирующие клетки (APC).

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

Дополнительные аспекты данного изобретения относятся к композициям, включающим вакцины, которые включают любую из композиций, связанных с данным изобретением.

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

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

Фигура демонстрирует, что специфические к никотину антитела были индуцированы синтетическими наночастицами, которые транспортировали антиген никотина и адъювант и из которых адъювант, но не антиген, заметно высвобождался за 24 ч.

#### **Подробное описание**

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

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе выше или ниже, тем самым включены ссылкой во всей их полноте для любых целей.

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

#### **Введение.**

Данное изобретение является полезным в том, что оно представляет путь доставки антигенов с иммуномодулирующими средствами для оптимальной индукции иммунных ответов на антиген. Представленные композиции и способы предусматривают высвобождение иммуномодулирующего средства до или одновременно с антигеном. Такое высвобождение может обеспечить сильные и долговременные иммунные ответы и представляет, таким образом, особый интерес применения вакцин для профилактики и лечения. В некоторых вариантах осуществления антигены могут быть связаны с синтетическими наночастицами так, что они присутствуют на поверхности синтетических наночастиц, инкапсулированы в наночастицы или и то и другое. В вариантах осуществления иммуномодулирующее средство усиливает иммунный ответ на антиген.

Авторы неожиданно и к удивлению обнаружили, что проблемы и ограничения, отмеченные выше, могут быть преодолены путем осуществления данного изобретения, раскрытого в данном документе. В частности, авторы неожиданно обнаружили, что возможно обеспечение композиций и связанных с ними способов, включающих синтетические наночастицы, которые включают (a) иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наночастицей; и (b) антиген, связанный с синтетическим наночастицей; при этом иммуномодулирующее средство и антиген отделяются от синтетического наночастицы.

ля согласно следующему соотношению:

$$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,2,$$

где  $IA(\text{высв.})\%$  определяется как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  ч, деленный на сумму веса иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  ч, выраженный в весовом проценте и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей, и где  $A(\text{высв.})\%$  определяют как вес антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  ч, деленный на сумму веса антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  ч, плюс вес антигена, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель *in vitro* водной среды при pH 4,5 в течение  $t$  ч, выраженный в весовом проценте и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей; и где  $t$  равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42 или 48 ч. В предпочтительных вариантах осуществления  $t$  равно 12, 24 или 48 ч.

В вариантах осуществления иммуномодулирующее средство и антиген отделяются от синтетического наноносителя согласно следующему соотношению:

$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,3,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,4,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,5,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,6,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,7,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,8,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 1,9,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 2,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 2,5,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 3,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 3,5,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 4,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 4,5,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 5,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 6,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 7,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 8,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 9,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 15,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 20,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 25,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 30,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 40,$	$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 50,$
$IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 75$ или $IA(\text{высв.})\%/A(\text{высв.})\% \geq 100$ , где $IA(\text{высв.})\%$ , $A(\text{высв.})\%$ и $t$ являются такими, как определено выше.		

В некоторых вариантах осуществления композиции и относящиеся к ним способы включают синтетические наноносители, которые включают (а) иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическим наноносителем; и (б) антиген, связанный с синтетическим наноносителем; где высвобождается по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 или 90% иммуномодулирующего средства, в то время как антиген заметно не высвобождается. В данных вариантах осуществления процент высвобожденного составляет  $100 \times$  (вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  ч, деленный на сумму веса иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  ч, взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей). В данных вариантах осуществления  $t$  является таким, как определено выше. В предпочтительных вариантах осуществления  $t$  равно 12, 24 или 48 ч.

В частности, авторы отметили, что лизосомы иммунных клеток меняют свое поведение, если они содержат конкретное вещество, которое не "расщепляется" за период 24-48 ч после того, как были поглощены клеткой посредством эндоцитоза. Как правило, большая часть поглощенных посредством эндоцитоза биологических материалов расщепляются на молекулы меньшего размера (такие как аминокислоты, небольшие пептиды или нуклеиновые кислоты), которые становятся доступными для клеточного метаболизма или удаления из клетки. Тем не менее, лизосомы, которые не могут расщепить частицы, которые они содержат, за период 24-48 ч модифицируются клеткой. Теряются сигнальные рецепторы и другие системы, и лизосома превращается в "тупиловую" везикулу, которая, наконец, перерабатывается для удаления из клетки. Следовательно, после эндоцитоза частицы клеткой иммунной системы есть окно времени. Если синтетический наноноситель не высвобождает свой полезный груз иммуномодулирующего средства в пределах этого окна 24-48 ч, предпочтительно 12 ч, то сигнальные рецепторы, которые предназначены для нацеливания, могут быть удалены с везикулы. Это в свою очередь делает любое последующее высвобождение иммуномодулирующего средства в этой везикуле, по большей мере, неуместным при воздействии на иммуногенные ответы.

Авторы также отметили, что наличие и вовлеченность сигнальных рецепторов, таких как Toll-подобные рецепторы, во время поглощения антигена может контролировать кинетику и результат активации и/или созревания иммунных клеток (например, созревания фагосом). Наличие и вовлеченность сигнальных рецепторов не только ведет к более быстрому созреванию иммунных клеток, но также наделяет иммунные клетки большей способностью обеспечивать пептиды для узнавания молекулами основного комплекса гистосовместимости (МНС) (Blander, Ann. Rheum. Dis. 2008: 67(Suppl III):iii44-iii49).

Желательно, чтобы передача сигнала рецептором у иммунных клеток происходила до или одновременно с поглощением антигена. Представленные в данном документе композиции и способы предусматривают такую передачу сигнала рецептором путем доставки иммуномодулирующего средства и антигена в виде части синтетического наноносителя, что позволяет высвободить иммуномодулирующее средство до или одновременно с антигеном. В вариантах осуществления высвобождение иммуномодулирующего средства или антигена происходит, если связь между иммуномодулирующим средством или антигеном и синтетическим наноносителем в значительной мере ослабляется или исчезает. Такая связь может быть ослаблена или устранена посредством ослабления или устранения связывания между иммуномодулирующим средством или антигеном и связывающей частью (частью, связывающей иммуномодулирующее средство или антиген соответственно). Такая связь также может быть ослаблена или устранена путем разложения синтетического наноносителя так, чтобы иммуномодулирующее средство или антиген высвободились из состояния "заключенности" в синтетическом наноносителе. В таком варианте осуществления иммуномодулирующее средство или антиген не связываются с синтетическим наноносителем в результате связывания перед указанным разложением. Кроме того, такая связь может быть ослаблена или устранена путем разложения синтетического наноносителя так, чтобы иммуномодулирующее средство или антиген все еще оставались связанными с частью синтетического наноносителя (например, посредством иммуномодулирующей или связывающей антиген части соответственно), но чтобы указанная часть в удовлетворительной степени разложилась с тем, чтобы стать способной индуцировать иммунный ответ. В вариантах осуществления иммунный ответ является подобным или таким же как и иммунный ответ, который был бы вызван в такой же среде иммуномодулирующим средством или антигеном в несвязанном с частью синтетического наноносителя состоянии.

Предпочтительно, высвобождение иммуномодулирующего средства или антигена происходит в лизосоме или эндосоме. Следовательно, высвобождение иммуномодулирующего средства или антигена предпочтительно происходит при pH 4,5. Эффективность высвобождения иммуномодулирующего средства в окне времени может быть аппроксимирована путем сравнения скорости высвобождения *in vitro* антигена из синтетического наноносителя со скоростью высвобождения *in vitro* иммуномодулирующего средства при pH среды приблизительно 4,5. Высвобождение антигена из синтетического наноносителя служит в качестве индикатора того, насколько быстро синтетический наноноситель расщепляется лизосомой клетки иммунной системы. В действительности было обнаружено, что антиген может быть связан с наноносителем таким образом, что высвобождение не определяется *in vitro* при pH 4,5, но зато при основных условиях. В таких случаях это демонстрирует, что связывание антигена с синтетическим наноносителем является очень стабильным при физиологических условиях (например, при pH 7,4 или 4,5), и что, в целом, высвобождение антигена будет происходить по мере расщепления синтетического наноносителя *in vivo*. Из этого следует, что такой синтетический наноноситель будет обеспечивать более быстрое высвобождение иммуномодулирующего средства.

Если иммуномодулирующее средство высвобождается из синтетического наноносителя быстрее, чем антиген при стимуляции условиями с низким pH лизосомы и в соответствующем окне времени, то это является указанием на то, что активная лизосома - и, соответственно, клетка иммунной системы - может находиться под влиянием иммуномодулирующего средства. Если верно обратное, то это является указанием на то, что некоторая часть или весь груз иммуномодулирующего средства может не обладать оптимальным эффектом на клетку. Соответственно, синтетические наноносители по данному изобретению могут обеспечить больший иммунный ответ(ответы) и, в результате, усиленную терапевтическую полезность субъектам.

### Определения

"Злоупотребляемое вещество" является любым веществом, употребляемым субъектом (например, человеком) с целями, отличными от тех, для которых оно предназначено, или способом, или в количествах, отличных от предписанных врачом. В некоторых вариантах осуществления злоупотребляемое вещество является лекарством, таким как запрещенное лекарство. В определенных вариантах осуществления злоупотребляемое вещество является безрецептурным лекарством. В некоторых вариантах осуществления злоупотребляемое вещество является предписанным лекарством. Злоупотребляемое вещество в некоторых вариантах осуществления является веществом, вызывающим привыкание. В некоторых вариантах осуществления злоупотребляемое вещество обладает психотропными действиями и, таким образом, включает летучие препараты и растворители. В других вариантах осуществления злоупотребляемое вещество является веществом, которое не обладает психотропными действиями или не обладает отравляющими свойствами, и, таким образом, включает анаболические стероиды. Вещества, которыми злоупотребляют, включают, но без ограничений, каннабиноиды (например, гашиш, марихуана), депрессанты (например, барбитураты, бензодиазепины, флунитразепам (рогипнол), GHB, метаквалон (куаалюды)), диссоциативные анестетики (например, кетамин, PCP), галлюциногены (например, ЛСД, мескалин, псилоцибин), опиоиды и производные морфина (например, кодеин, фентанил, героин, морфин, опиум), стимуляторы (амфетамины, кокаин, экстази (MDMA), метамфетамин, метилфенидат (риталин), никотин), анаболические стероиды и летучие вещества. В некоторых вариантах осуществления злоупотребляемое вещество для включения в наноноситель является целой молекулой или ее частью.

"Вызывающее привыкание вещество" является веществом, которое вызывает навязчивое состояние, компульсивное побуждение, или физическую зависимость, или психологическую зависимость. В некоторых вариантах осуществления вызывающее привыкание вещество является запрещенным лекарством. В другом варианте осуществления вызывающее привыкание вещество является безрецептурным лекарством. В других вариантах осуществления вызывающее привыкание вещество является предписанным лекарством. Вызывающие привыкание вещества включают, но без ограничения, кокаин, героин, марихуану, метамфетамины и никотин. В некоторых вариантах осуществления вызывающее привыкание вещество для включения в наночастицу является целой молекулой или ее частью.

"Адьювант" означает средство, которое не представляет собой специфический антиген, но увеличивает силу и продолжительность иммунного ответа на антиген. Такие адьюванты могут включать, но без ограничений, стимуляторы образ распознающих рецепторов, таких как Toll-подобные рецепторы, RIG-I и NOD-подобные рецепторы (NLR), минеральные соли, такие как квасцы, квасцы, комбинированные с монофосфорилированными липидами (MPL) A из *Enterobacteria*, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* или *Shigella flexneri*, или, в частности, с MPL® (AS04), MPL A из вышеупомянутых бактерий отдельно, сапонины, такие как QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX™, эмульсии, такие как MF59™, Montanide® ISA 51 и ISA 720, AS02 (QS21+сквален+MPL®), липосомы и липосомальные составы, такие как AS01, синтезированные или специально полученные микрочастицы и микротранспортеры, такие как происходящие от бактерий везикулы из внешней мембраны (OMV) из *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* и других, или хитозановые частицы, средства, образующие депо, такие как блок-сополимеры Pluronic®, специально модифицированные или полученные пептиды, такие как мурамил-дипептид, аминоалкилглюкозаминида 4-фосфаты, такие как RC529, или белки, такие как бактериальные токсиды или фрагменты токсинов. В вариантах осуществления адьюванты включают агонисты для образ распознающих рецепторов (PRR), включая, но без ограничений, Toll-подобные рецепторы (TLR), в особенности TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 и/или их комбинации. В других вариантах осуществления адьюванты включают агонисты для Toll-подобных рецепторов 3, агонисты для Toll-подобных рецепторов 7 и 8 или агонисты для Toll-подобного рецептора 9; предпочтительно, упомянутые адьюванты включают имидазохинолины; такие как резиквимод (также известный как R848); адениновые производные, такие как те, которые раскрыты в патенте США 6329381 (Sumitomo Pharmaceutical Company); иммуностимулирующую ДНК или иммуностимулирующую РНК. В специфических вариантах осуществления синтетические наночастицы включают в качестве адьювантов соединения, которые представляют собой агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR) 7 и 8 ("агонисты TLR 7/8"). С практической стороны соединения-агонисты TLR 7/8 раскрыты в патенте США №6696076 Tomai et al., включая, но без ограничения, имидазохинолинамины, имидазопиридинамины, 6,7-конденсированные циклоалкилимидазопиридинамины и 1,2-мостиковые имидазохинолинамины. Предпочтительные адьюванты включают имиквимод и резиквимод. В конкретных вариантах осуществления адьювант может быть агонистом для поверхностной молекулы CD40 DC. В определенных вариантах осуществления синтетический наночастица включает адьювант, который способствует созреванию DC (необходимых для эффективного примирования наивных Т-клеток) и продуцирования цитокинов, таких как интерфероны I типа, которые в свою очередь стимулируют иммунный ответ с помощью антител и цитотоксический иммунный ответ против желаемого антигена. В вариантах осуществления адьюванты также могут содержать иммуностимулирующие молекулы РНК, такие как, но без ограничения, dsRNA или поли I:C (TLR3 стимулятор), и/или раскрытые у F. Heil et al., "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" Science 303(5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" U.S. Pat. Appl. Publ. US 2006241076; G. Lipford et al., "Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Immunostimulatory G, U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods" WO 2003086280 A2. В некоторых вариантах осуществления адьювантом может быть агонист TLR-4, такой как бактериальный липополисахарид (LPS), VSV-G и/или HMGB-1. В некоторых вариантах осуществления адьюванты могут включать агонисты TLR-5, такие как флагеллин или его части, или производные, включая, но без ограничения, те, которые раскрыты в патентах США 6130082, 6585980 и 7192725. В специфических вариантах осуществления синтетические наночастицы включают лиганд Toll-подобного рецептора (TLR)-9, например иммуностимулирующие молекулы ДНК, содержащие CpG, которые индуцируют секрецию интерферона I типа и стимулируют активацию Т- и В-клеток, приводящую к повышенной продукции антител и цитотоксическому Т-клеточному ответу (Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J. Exp. Med. 1997. 186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. Eur. J. Immunol. 1997. 27:2340-2344; Roman et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. Nat. Med. 1997. 3:849-854;

Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998. 160:870-876; Lipford et al., Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* 1998. 6:496-500. В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть провоспалительными стимулами, выделенными из некротических клеток (например, кристаллы уратов). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами каскада комплемента (например, CD21, CD35 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления адъюванты могут быть активированными компонентами иммунных комплексов. Адъюванты также включают агонисты рецептора комплемента, такие как молекула, которая связывается с CD21 или CD35. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора комплемента индуцирует опсонизацию эндогенного комплемента синтетического наноносителя. В некоторых вариантах осуществления адъюванты являются цитокинами, которые относятся к малым белкам или биологическим факторам (в диапазоне 5-20 кДа), которые выделяются клетками и имеют специфические эффекты на межклеточное взаимодействие, коммуникацию и поведение других клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист цитокинового рецептора является небольшой молекулой, антителом, сшитым белком или аптамером.

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

"Аллерген" относится к любому средству, которое может вызывать аллергический ответ у субъекта. Аллергены включают, но без ограничения, обычную пыль, пыльцу, растения, перхоть животных, лекарства (например, пенициллин), пищевые аллергены, яд насекомых, споры грибов, вирусы и бактерии.

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

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

В вариантах осуществления нацеливающие части для известных мишеней на макрофагах ("МФ") содержат любую нацеливающую часть, которая специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), который заметно экспрессируется и/или представлен на макрофагах (т.е. маркеры субкапсулярного синуса-МФ). Типичные маркеры СК-МФ включают, но без ограничения, CD4 (L3T4, W3/25, T4); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ L-цепь интегрина); CD11b ( $\alpha$ M-цепь интегрина, CR3, Mol, C3niR, Mac-1); CD11c ( $\alpha$ X-интегрин, p150, 95, AXb2); CDw12 (p90-120); CD13 (APN, gp150, EC 3.4.11.2); CD14 (LPS-R); CD15 (X-гаптен, Льюис X, SSEA-1,3-FAL); CD15s (сиалил-Льюис X); CD15u (3'-сульфо-Льюис X); CD15su (6-сульфо-сиалил-Льюис X); CD16a (FCRIIIA); CD16b (FcγRIIIb); CDw17 (лактозилцерамид, LacCer); CD18 (интегрин  $\beta$ 2, CD11a,b,c  $\beta$ -субъединица); CD26 (DPP IV эктоэнзим, ADA-связывающий белок); CD29 (тромбоцитарный GPIIa,  $\beta$ -1 интегрин, GP); CD31 (PECAM-1, эндокам); CD32 (FCγRII); CD33 (gp67); CD35 (CR1, C3b/C4b рецептор); CD36 (GpIIIb, GPIV, PASIV); CD37 (gp52-40); CD38 (АДФ-рибозилциклаза, T10); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD43 (сиалофорин, лейкосиалин); CD44 (EMCRII, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, нейтрофилин); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49a (VLA-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ 1-интегрин); CD49b (VLA-2 $\alpha$ , gp1a,  $\alpha$ 2-интегрин); CD49c (VLA-3 $\alpha$ ,  $\alpha$ 3-интегрин); CD49e (VLA-5 $\alpha$ ,  $\alpha$ 5-интегрин); CD49f (VLA-6 $\alpha$ ,  $\alpha$ 6-интегрин, gp1c); CD50 (ICAM-3); CD51 (интегрин  $\alpha$ , VNR- $\alpha$ , витронектин-R $\alpha$ ); CD52 (CAMPATH-1, HE5); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD59 (1F5Ag, H19, протектин, MAC1F, M1RL, P-18); CD60a (GD3); CD60b (9-O-ацетил GD3); CD61 (GP IIIa,  $\beta$ 3-интегрин); CD62L (L-селектин, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD63 (LIMP, MLA1, gp55, NGA, LAMP-3, ME491); CD64 (FcγRI); CD65 (церамид, VIM-2); CD65s (сиа-

лированный CD65, VIM2); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD75 (сиалоза-маскированный лактозамин); CD75S ( $\alpha$ 2,6-сиалированный лактозамин); CD80 (B7, B7-1, BB1); CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD84 (p75, GR6); CD85a (ILT5, LIR2, HL9); CD85d (ILT4, LIR2, MIR10); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CD85k (ILT3, LIR5, HM18); CD86 (B7-2/B70); CD87 (uPAR); CD88 (C5aR); CD89 (Fc-рецептор к IgA, Fc $\alpha$ R); CD91 ( $\alpha$ 2M-R, LRP); CDw92 (p70); CDw93 (GR11); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD97 (BL-KDD/F12); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD99R (CD99, Mab рестриктивный); CD100 (SEMA4D); CD101 (IGSF2, P126, V7); CD102 (ICAM-2); CD111 (PVRL1, HveC, PRR1, нектин 1, HlgR); CD112 (HveB, PRR2, PVRL2, нектин 2); CD114 (CSF3R, G-CSRF, HG-CSFR); CD115 (c-fms, CSF-1R, M-CSFR); CD116 (GMCSFR $\alpha$ ); CDw119 (IFN $\gamma$ R, IFN $\gamma$ RA); CD120a (TNFRI, p55); CD120b (TNFRII, p75, TNFR p80); CD121b (IL-1R типа 2); CD122 (IL2R $\beta$ ); CD123 (IL-3R $\alpha$ ); CD124 (IL-4R $\alpha$ ); CD127 (p90, IL-7R, IL-7R $\alpha$ ); CD128a (IL-8Ra, CXCR1, (ориентировочно переименованный как CD181)); CD128b (IL-8Rb, CSCR2, (ориентировочно переименованный как CD182)); CD130 (gp130); CD131 (общая  $\beta$ -субъединица); CD132 (общая  $\gamma$ -цепь, IL-2R $\gamma$ ); CDw136 (MSP-R, RON, p158-ron); CDw137 (4-1BB, ILA); CD139; CD141 (тромбомодулин, фетомодулин); CD147 (басигин, EMMPRIN, M6, OX47); CD148 (HPTP- $\eta$ , p260, DEP-1); CD155 (PVR); CD156a (CD156, ADAM8, MS2); CD156b (TACE, ADAM17, cSVP); CDw156C (ADAM10); CD157 (Mo5, BST-1); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD165 (AD2, gp37); CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR); CD169 (сиалоадгезин, сиглек-1); CD170 (сиглек-5); CD171 (L1CAM, NILE); CD172 (SIRP-1 $\alpha$ , MyD-1); CD172b (SIRP $\beta$ ); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD181 (CXCR1, (прежде известный как CD128a)); CD182 (CXCR2, (прежде известный как CD128b)); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD191 (CCR1); CD192 (CCR2); CD195 (CCR5); CDw197 (CCR7 (был CDw197)); CDw198 (CCR8); CD204 (MSR); CD205 (DEC-25); CD206 (MMR); CD207 (лангерин); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CD220 (инсулин R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGFII-R); CD224 (GGT); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD230 (прионный белок (PrP)); CD232 (VESP-R); CD244 (2B4, P38, NAIL); CD245 (p220/240); CD256 (APRIL, TALL2, суперсемейство TNF (лиганд), член 13); CD257 (BLYS, TALL1, суперсемейство TNF (лиганд), член 13b); CD261 (TRAIL-R1, суперсемейство TNF-R, член 10a); CD262 (TRAIL-R2, суперсемейство TNF-R, член 10b); CD263 (TRAIL-R3, суперсемейство TNF-R, член 10c); CD264 (TRAIL-R4, суперсемейство TNF-R, член 10d); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD277 (BT3.1, семейство B7: бутирофилин 3); CD280 (TEM22, ENDO180); CD281 (TLR1, Toll-подобный рецептор 1); CD282 (TLR2, Toll-подобный рецептор 2); CD284 (TLR4, Toll-подобный рецептор 4); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3, Na/K-АТФаза,  $\beta$ 3-субъединица); CD300a (CMRF-35H); CD300C (CMRF-35A); CD300e (CMRF-35L1); CD302 (DCL1); CD305 (LAIR1); CD312 (EMR2); CD315 (CD9P1); CD317 (BST2); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw328 (сиглек-7); CDw329 (сиглек-9); CD68 (gp 110, макросиалин); и/или рецептор маннозы; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия.

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



CD312 (EMR2); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD320 (8D6) и CD68 (gp110, макросиалин); МНС II класса; BDCA-1; сиглек-Н; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия.

В вариантах осуществления нацеливание может быть выполнено с помощью любой нацеливающей части, которая специфически связывается с любым объектом (например, белком, липидом, углеводом, малой молекулой и т.д.), который заметно экспрессирован и/или представлен на В-клетках (т.е. маркер В-клеток). Типичные маркеры В-клеток включают, но без ограничения, CD1c (M241, R7); CD1d (R3); CD2 (рецептор Е-розетки, T11, LFA-2); CD5 (T1, Trp67, Leu-1, Ly-1); CD6 (T12); CD9 (p24, DRAP-1, MRP-1); CD11a (LFA-1 $\alpha$ ,  $\alpha$ Л-цепь интегрина); CD11b ( $\alpha$ М-цепь интегрина, CR3, Mol, C3niR, Mac-1); CD11c ( $\alpha$ Х-интегрин, P150, 95, AXb2); CDw17 (лактозилцерамид, LacCer); CD18 (интегрин  $\beta$ 2,  $\beta$ -субъединица CD11a, b, c); CD19 (B4); CD20 (B1, Bp35); CD21 (CR2, EBV-R, C3dR); CD22 (BL-CAM, Lyb8, сиглек-2); CD23 (FceRII, B6, BLAST-2, Leu-20); CD24 (BBA-1, HSA); CD25 (Тас-антиген, IL-2R $\alpha$ , p55); CD26 (DPP IV эктоэнзим, ADA-связывающий белок); CD27 (T14, S152); CD29 (тромбоцитарный GPIIa, интегрин (3-1, GP); CD31 (PECAM-1, эндокам); CD32 (FC $\gamma$ RH); CD35 (CR1, C3b/C4b рецептор); CD37 (gp52-40); CD38 (АДФ-рибозилциклаза, T10); CD39 (АТФ-дегидрогеназа, NTP-дегидрогеназа-1); CD40 (Bp50); CD44 (ECMRII, H-CAM, Pgp-1); CD45 (LCA, T200, B220, Ly5); CD45RA; CD45RB; CD45RC; CD45RO (UCHL-1); CD46 (MCP); CD47 (gp42, IAP, OA3, нейтрофилин); CD47R (MEM-133); CD48 (Blast-1, Hulym3, BCM-1, OX-45); CD49b (VLA-2 $\alpha$ , gpl $\alpha$ ,  $\alpha$ 2-интегрин); CD49c (VLA-3 $\alpha$ ,  $\alpha$ 3-интегрин); CD49d (VLA-4 $\alpha$ ,  $\alpha$ 4-интегрин); CD50 (ICAM-3); CD52 (CAMPATH-1, HES); CD53 (OX-44); CD54 (ICAM-1); CD55 (DAF); CD58 (LFA-3); CD60a (GD3); CD62L (L-селектин, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1); CD72 (Ly-19.2, Ly-32.2, Lyb-2); CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); CD74 (Ii, инвариантная цепь); CD75 (сиало-замаскированный лактозамин); CD75S ( $\alpha$ 2,6-сиализированный лактозамин); CD77 (Рк-антиген, BLA, CTH/Gb3); CD79a (Ig $\alpha$ , MB1); CD79b (Ig $\beta$ , B29); CD80; CD81 (TAPA-1); CD82 (4F9, C33, IA4, KAI1, R2); CD83 (HB15); CD84 (P75, GR6); CD85j (ILT2, LIR1, MIR7); CDw92 (p70); CD95 (APO-1, FAS, TNFRSF6); CD98 (4F2, FRP-1, RL-388); CD99 (MIC2, E2); CD100 (SEMA4D); CD102 (ICAM-2); CD108 (SEMA7A, антиген группы крови JMH); CDw119 (IFN $\gamma$ R, IFN $\gamma$ Ra); CD120a (TNFR1, p55); CD120b (TNFR2, p75, TNFR p80); CD121b (IL-1R типа 2); CD122 (IL2R $\beta$ ); CD124 (IL-4R $\alpha$ ); CD130 (gp130); CD132 (общая  $\gamma$ -цепь, IL-2R $\gamma$ ); CDw137 (4-1BB, ILA); CD139; CD147 (басигин, EMMPRIN, M6, OX47); CD150 (SLAM, IPO-3); CD162 (PSGL-1); CD164 (MGC-24, MUC-24); CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP); CD167a (DDR1, trkE, cak); CD171 (LICMA, NILE); CD175s (сиалил-Tn (S-Tn)); CD180 (RP105, Bgp95, Ly64); CD184 (CXCR4, NPY3R); CD185 (CXCR5); CD192 (CCR2); CD196 (CCR6); CD197 (CCR7 (был CDw197)); CDw197 (CCR7, EB11, BLR2); CD200 (OX2); CD205 (DEC-205); CDw210 (CK); CD213a (CK); CDw217 (CK); CDw218a (IL18R $\alpha$ ); CDw218b (IL18R $\beta$ ); CD220 (инсулин R); CD221 (IGF1 R); CD222 (M6P-R, IGFII-R); CD224 (GGT); CD225 (Leu13); CD226 (DNAM-1, PTA1); CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA); CD229 (Ly9); CD230 (прионный белок (Prp)); CD232 (VESP-R); CD245 (p220/240); CD247 (зета-цепь CD3); CD261 (TRAIL-R1, суперсемейство TNF-R, член 10a); CD262 (TRAIL-R2, суперсемейство TNF-R, член 10b); CD263 (TRAIL-R3, суперсемейство TNF-R, член 10c); CD264 (TRAIL-R4, суперсемейство TNF-R, член 10d); CD265 (TRANCE-R, суперсемейство TNF-R, член 11a); CD267 (TAC1, суперсемейство TNF-R, член 13B); CD268 (BAFFR, суперсемейство TNF-R, член 13C); CD269 (BCMA, суперсемейство TNF-R, член 16); CD275 (B7H2, ICOSL); CD277 (BT3.1.семейство B7: бутирофилин 3); CD295 (LEPR); CD298 (ATP1B3  $\beta$ 3-субъединица Na/K-АТФазы); CD300a (CMRF-35H); CD300c (CMRF-35A); CD305 (LAIR1); CD307 (IRTA2); CD315 (CD9P1); CD316 (EW12); CD317 (BST2); CD319 (CRACC, SLAMF7); CD321 (JAM1); CD322 (JAM2); CDw327 (сиглек-6, CD33L); CD68 (gp 100, макросиалин); CXCR5; VLA-4; МНС II класса; поверхностный IgM; поверхностный IgD; APRL и/или BAFF-R; где названия, указанные в круглых скобках, представляют собой альтернативные названия. Примеры маркеров включают такие, которые представлены в других местах данного документа.

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

"А(высв.)%" определяется как вес антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение t ч, деленный на сумму веса антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение

t ч, плюс вес антигена, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение t ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей. В данном документе t определяется как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42 или 48 ч. В предпочтительных вариантах осуществления t равно 12, 24 или 48 ч.

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

"Биоразлагаемый полимер" означает полимер, который распадается с течением времени при введении в организм субъекта. Биоразлагаемый полимер включает, но без ограничения, сложные полиэфиры, поликарбонаты, поликетали или полиамиды. Такие полимеры могут включать поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), сополимер(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает блок-сополимер простого полиэфира, например, поли(этиленгликоля) и сложного полиэфира, поликарбоната или полиамида, или другой биоразлагаемый полимер. В вариантах осуществления биоразлагаемый полимер включает блок-сополимер поли(этиленгликоля) и поли(молочной кислоты), поли(гликолевой кислоты), блок-сополимера(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактона. В некоторых вариантах осуществления, однако, биоразлагаемый полимер не включает полиэфир, такой как поли(этиленгликоль), или состоит только из полиэфира. В целом, для применения в составе синтетического наноносителя биоразлагаемый полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C. Биоразлагаемый полимер в вариантах осуществления имеет средневесовой молекулярный вес в диапазоне от приблизительно 800 до приблизительно 50000 Да, который определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В некоторых вариантах осуществления средневесовой молекулярный вес составляет от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да, предпочтительно от 800 до 10000 Да, который определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В других вариантах осуществления средневесовой молекулярный вес составляет от 1000 до 10000 Да, что определяют с помощью гель-проникающей хроматографии. В варианте осуществления биоразлагаемый полимер не включает поликеталь или его элементарное звено.

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

"Происходящий от" означает адаптированный или модифицированный по сравнению с исходным

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

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

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

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

"Проявляет pH-чувствительную диссоциацию" означает, что связь между двумя частицами, такими как иммуномодулирующее средство или антиген и синтетический наноноситель, или иммуномодулирующее средство, или связывающая антиген часть, соответственно, значительно ослабляется или устраняется путем изменения pH среды. В вариантах осуществления соответствующие pH-чувствительные диссоциации могут удовлетворять любому из приведенных в данном документе соотношений. В целом, связь между иммуномодулирующим средством и синтетическим наноносителем значительно ослабляется или устраняется при pH 4,5 по сравнению со связью между антигеном и синтетическим наноносителем. Соотношения, которые определяют диссоциацию иммуномодулирующего средства и антигена, приведены в других частях данного документа.

"IA (высв.)%" определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  ч, деленный на сумму веса иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  ч, плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетическом наноносителе при воздействии на синтетический наноноситель водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение  $t$  ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее среди образцов синтетических наноносителей. В данном документе  $t$  определяется как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42 или 48 ч. В предпочтительных вариантах осуществления  $t$  равно 12, 24 или 48 ч.

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

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

"Связывающая иммуномодулирующее средство часть" представляет собой любую часть, посредством которой иммуномодулирующее средство связывается с синтетическим наноносителем. Такие части включают ковалентные связи, такие как амидная связь или сложноэфирная связь, а также отдельные молекулы, которые связывают (ковалентно или не ковалентно) иммуномодулирующее средство с синтетическим наноносителем. Такие молекулы включают линкеры или полимеры или их элементарное звено. Например, связывающая иммуномодулирующее средство часть может включать загруженный полимер, с которым электростатически связывается иммуномодулирующее средство (например, иммуностимулирующая нуклеиновая кислота). В качестве другого примера связывающая иммуномодулирующее средство

во часть может включать полимер или его элементарное звено, с которым ковалентно связывается иммуномодулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления часть включает сложный полиэфир. В других вариантах осуществления часть включает поли(этиленгликоль), поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), блок-сополимер(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон. Часть также может включать элементарное звено из любого из вышеупомянутых полимеров, такое как лактид или гликолид.

"Инфекционный агент" относится к любому агенту, который происходит от бактерии, гриба, вируса, простейшего или паразита. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой поксвирус, вирус оспы человека, вирус Эбола, вирус, вызывающий "марбургскую болезнь", вирус лихорадки Денге, вирус гриппа, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, вирус кори, вирус иммунодефицита человека, вирус папилломы человека, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус Джона Каннингема, рабдовирус, ротавирус, риновирус, аденовирус, папилломавирус, парвовирус, пикорнавирус, полиовирус, вирус, который вызывает эпидемический паратиф, вирус, который вызывает бешенство, реовирус, вирус краснухи, тогавирус, ортомиксовирус, ретровирус, гепаднавирус, вирус Коксаки, вирус энцефалита лошадей, вирус японского энцефалита, вирус желтой лихорадки, вирус лихорадки долины Рифт, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D или вирус гепатита E.

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

"Полученный" означает взятый без адаптации или модификации из исходного источника. Например, в вариантах осуществления антигены, полученные из источника, могут включать исходную последовательность аминокислотных остатков, обнаруженную в этом источнике. В других вариантах осуществления, например, антигены, полученные из источника, могут включать исходную молекулярную структуру, обнаруженную в этом источнике.

"Фармацевтически приемлемый эксципиент" означает фармакологически неактивное вещество, добавленное к композиции по данному изобретению для дальнейшего облегчения введения данной композиции. Примеры, без ограничения, фармацевтически приемлемых наполнителей включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные разбавители, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

"Слабоиммуногенный антиген" относится к антигену, который не запускает вообще или запускает на удовлетворительном уровне желательный иммунный ответ. Применяемое в данном документе выражение "удовлетворительный" относится к способности вызывать выявляемый или защитный иммунный ответ при введении в композиции, которая не задействует описываемый в данном документе наноноси-

тель, например свободный антиген, смешанный с адъювантом в отсутствие наночастицы. В некоторых вариантах осуществления желаемый иммунный ответ должен лечить или предупреждать заболевание или состояние. В определенных вариантах осуществления желаемый иммунный ответ должен ослаблять один или несколько симптомов заболевания или состояния. Слабоиммуногенные антигены включают, но без ограничения, малые молекулы и углеводороды.

"Скорость высвобождения" означает скорость, с которой связанное иммуномодулирующее средство или антиген выходит из частицы в окружающую среду в тесте высвобождения *in vitro*. Сначала получается синтетический наночастица для тестирования высвобождения посредством размещения его в соответствующей среде высвобождения *in vitro*. Это обычно осуществляется посредством замены буфера после центрифугирования с осаждением синтетического наночастицы и воссоздания синтетических наночастиц в мягких условиях. Данный анализ начинают путем размещения образца при 37°C в соответствующем приборе с контролируемой температурой. В различные моменты времени забирается образец. В целом, связывание антигена с синтетическим наночастицей посредством связывающей антиген части является более стабильным при физиологическом pH (например, pH 4,5), чем связывание иммуномодулирующего средства с синтетическим наночастицей посредством связывающей иммуномодулирующее средство части. В вариантах осуществления связывание антигена с синтетическим наночастицей является менее pH-чувствительным, чем связывание иммуномодулирующего средства с синтетическим наночастицей. В вариантах осуществления стабильность связывания антигена с синтетическим наночастицей определяется посредством измерения количества антигена, высвобождаемого из синтетического наночастицы. В вариантах осуществления количество антигена, высвобождаемого из синтетического наночастицы, значительно не отличается при pH 4,5 от высвобождаемого при pH 7,4. В вариантах осуществления количество антигена, высвобождаемого из синтетического наночастицы при pH 4,5, меньше, чем количество иммуномодулирующего средства, высвобождаемого из синтетического наночастицы. В вариантах осуществления количество высвобождаемого антигена не является выявляемым при pH 7,4 или 4,5.

Синтетические наночастицы отделяются от среды высвобождения путем центрифугирования с осаждением синтетических наночастиц. Среда высвобождения анализируется на предмет иммуномодулирующего средства или антигена, которые были диспергированы из синтетических наночастиц. Иммуномодулирующее средство или антиген измеряется с помощью ВЭЖХ для определения содержания и качества иммуномодулирующего средства или антигена. Осадок, содержащий оставшиеся захваченное иммуномодулирующее средство или антиген, растворяется в растворителях или гидролизуются основанием с освобождением захваченного иммуномодулирующего средства или антигена из синтетических наночастиц. Затем остаток, содержащий иммуномодулирующее средство или антиген, также измеряется с помощью ВЭЖХ для определения содержания и качества иммуномодулирующего средства или антигена, которые не высвободились на данный момент времени.

Равновесие масс ограничивается иммуномодулирующим средством или антигеном, которые были высвобождены в среду высвобождения, и тем, что остается в синтетических наночастицах. Данные представлены в виде высвобожденной фракции или высвобожденного чистого веса, представленного в микрограммах, высвобожденных за период времени.

"Малая молекула" в данной области техники следует понимать как органическая молекула, которая по размеру меньше приблизительно 2000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы меньше приблизительно 1500 г/моль или меньше приблизительно 1000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы меньше приблизительно 800 г/моль или меньше приблизительно 500 г/моль. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы не являются полимерными и/или олигомерными. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы не являются белками, пептидами или аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы не являются нуклеиновыми кислотами или нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления малые молекулы не являются сахарами или полисахаридами.

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

"Синтетический наночастица(наночастицы)" означает дискретный объект, который не встречается в природе, и который обладает по меньшей мере одним размером, значение которого меньше или равно 5 мкм. Наночастицы альбумина специально включены в качестве синтетических наночастиц.

Синтетические наночастицы включают полимерные наночастицы. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут содержать одну или несколько полимерных матриц. Синтетические наночастицы, однако, также могут включать прочие наноматериалы и могут быть, например, липидно-полимерными наночастицами. В некоторых вариантах осуществления полимерная матрица может быть окружена покрывающим слоем (например, липосома, липидный монослой, мицелла и т.д.). В некоторых вариантах осуществления синтетический наночастица не является мицеллой. В некоторых вариантах осуществления синтетический наночастица может содержать ядро, включающее полимерную матрицу, окруженную липидным слоем (например, липидный бислой, липидный монослой и т.д.). В не-

которых вариантах осуществления различные элементы синтетических наночастиц могут быть связаны с полимерной матрицей.

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

Синтетические наночастицы могут включать наночастицы на основе липидов, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболлы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка (такие, как наночастицы альбумина). Синтетические наночастицы могут иметь ряд различных форм, включая, но без ограничения, сферическую, кубическую, пирамидальную, вытянутую, цилиндрическую, тороидальную и т.п. Синтетические наночастицы согласно данному изобретению имеют одну или несколько поверхностей. Примеры синтетических наночастиц, которые могут быть адаптированы для использования в практическом применении данного изобретения, включают: (1) биоразлагаемые наночастицы, раскрытые в патенте США 5543158, Gref et al., (2) полимерные наночастицы из опубликованной заявки на патент США 20060002852, Saltzman et al., (3) сконструированные литографическим способом наночастицы из опубликованной заявки на патент США 20090028910, DeSimone et al., (4) раскрытие WO 2009/051837, von Andrian et al., или (5) наночастицы, раскрытые в опубликованной заявке на патент США 2008/0145441, Renades et al.

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

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы являются сферами или сфероидными. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы плоские или пластинчатые. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы являются кубами или кубическими. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы являются овалами или эллипсами. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы являются цилиндрами, конусами или пирамидами.

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

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

"Т-клеточный антиген" означает любой антиген, который распознается и инициирует иммунный ответ в Т-клетках (например, антиген, который специфически распознается Т-клеточным рецептором на Т-клетках или клетке НКТ посредством презентации антигена или его части, которые связаны с молекулой класса I или класса II основного комплекса гистосовместимости (МНС) или связаны с CD1-комплексом). В некоторых вариантах осуществления антиген, являющийся Т-клеточным антигеном,

также является В-клеточным антигеном. В других вариантах осуществления Т-клеточный антиген также не является В-клеточным антигеном. Т-клеточные антигены обычно являются белками или пептидами. Т-клеточные антигены могут быть антигенами, которые стимулируют ответ CD8+ Т-клеток, ответ CD4+ Т-клеток или оба. Т-клеточные антигены, следовательно, в некоторых вариантах осуществления могут эффективно стимулировать оба типа ответов.

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

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

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

#### **Способы создания соединений, конъюгатов или синтетических наноносителей по изобретению**

Иммуномодулирующее средство и антиген могут быть связаны с синтетическим наноносителем любым способом так, чтобы диссоциация иммуномодулирующего средства и антигена от синтетического наноносителя удовлетворяла диссоциативному соотношению, приведенному в данном документе. Способы определения того, удовлетворяет ли или нет диссоциативное соотношение, приведены выше и в примерах.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство и/или антиген могут быть связаны (например, ковалентно) с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномодулирующее средство части или связывающей антиген части соответственно. В некоторых вариантах осуществления синтетический наноноситель состоит из полимеров, таких как биоразлагаемые полимеры (например, низкомолекулярные биоразлагаемые полимеры), а иммуномодулирующее средство и/или антиген связаны посредством связывающей иммуномодулирующее средство части или связывающей антиген части, соответственно, с полимером. Способы связывания иммуномодулирующих средств и антигенов с полимерами с образованием синтетических наноносителей по данному изобретению приведены ниже, а также в других частях данного документа, включая примеры.

Связывающие антиген части могут быть синтезированы с помощью методик для снижения их склонности к рН-чувствительной диссоциации. Такие методики могут включать устранение или уменьшение числа химических связей, присутствующих в связывающих антиген частях, которые чувствительны к разрыву вследствие рН-эффектов среды. Менее чувствительные связи вместо этого могут замещаться. Другие методики могут включать применение стерически затрудненных химических связей, которые чувствительны к кислотному или основному распаду.

Способы синтеза стабильных в кислоте/основании связывающих частей включает клик-химию с образованием триазола посредством 1,3-диполярной циклизации алкина с азидом, циклоприсоединение Дильса-Адлера с образованием шестичленных гетероциклов, присоединение Майкла или открытие эпоксида тиольной группой с образованием связи сера-углерод, связи азот-углерод путем открытия эпоксида амином или восстановительного аминирования амина альдегидом или кетоном, образование мочевины и

карбаматов посредством реакции амина с изоцианатами или цианатами, связи сера-сера путем окисления или открытия эпоксида амином. В вариантах осуществления реакционноспособная группа, такая как тиол, амин, алкин или азид, или двойная связь могут быть частью антигена. В вариантах осуществления такая реакционноспособная группа может быть частью, например, одной из аминокислот, такой как цистеин (тиол) или лизин (аминогруппа) или присоединенной к антигену с помощью пептидной или подобной химии.

Кроме того, антиген может содержаться в синтетическом наноносителе так, чтобы он был выставлен в окружающую среду после того, как будет так выставлено иммуномодулирующее средство. Например, синтетический наноноситель может состоять из двух или нескольких слоев, а антиген может быть связан с внутренним слоем, в то время как иммуномодулирующее средство может быть связано с внешним слоем. В качестве другого примера, иммуномодулирующее средство может быть связано с поверхностью синтетического наноносителя, в то время как антиген инкапсулирован в синтетический наноноситель.

В отличие от этого, части, связывающие иммуномодулирующее средство, могут быть синтезированы с помощью методик для увеличения их склонности к рН-чувствительной диссоциации. Такие методики могут включать включение или увеличение числа химических связей, присутствующих в связывающих антиген частях, которые чувствительны к разрыву вследствие рН-эффектов среды. Такие связи описаны более детально ниже.

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

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

Реакции или любому этапу из приведенных способов может быть позволено проходить в течение любого подходящего периода времени. В некоторых случаях реакции или любому этапу из приведенных способов позволяют проходить в течение приблизительно 10 мин, приблизительно 20 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 40 мин, приблизительно 50 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 12 ч, приблизительно 16 ч, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 суток, приблизительно 3 суток, приблизительно 4 суток или дольше. В некоторых случаях аликвоты реакционной смеси могут быть собраны и проанализированы в промежуточное время для определения хода реакции или любого этапа из приведенных способов. В некоторых вариантах осуществления реакция или любой этап из приведенных способов может осуществляться в инертной атмосфере в безводных условиях (например, в атмосфере азота или аргона, в безводных растворителях и т.д.).

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

Полимеры могут иметь любой подходящий молекулярный вес. Например, полимеры могут иметь



низкий или высокий молекулярный вес. Неограничивающие значения молекулярного веса включают 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 Да или более. В некоторых вариантах осуществления полимеры имеют средневесовой молекулярный вес от приблизительно 800 до приблизительно 10000 Да. В других вариантах осуществления любой из приведенных в данном документе полимеров имеет средневесовой молекулярный вес от приблизительно 800 до 10000 Да (например, 2000 Да). Молекулярный вес полимера может быть определен с помощью гелепроникающей хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C является биоразлагаемым или и тем, и другим. В других вариантах осуществления полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C, но растворимым при pH 4,5 и при 25°C. В еще других вариантах осуществления полимер является нерастворимым в воде при pH 7,4 и при 25°C, но растворимым при pH 4,5 и при 25°C и биоразлагаемым.

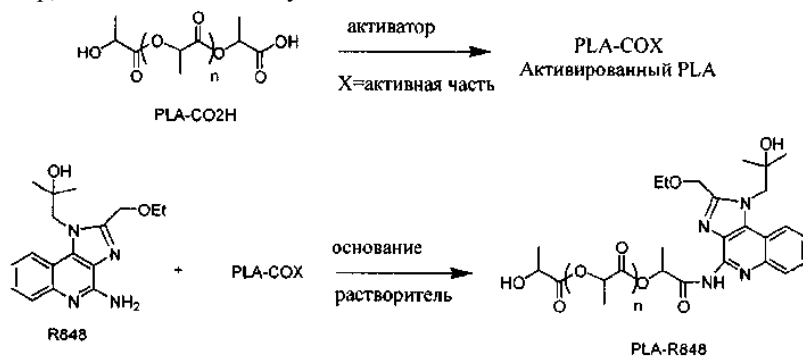
В некоторых вариантах осуществления полимер включает сложный полиэфир, поликарбонат, полиамид или простой полиэфир. В других вариантах осуществления полимер включает поли(этиленгликоль) (PEG), поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), блок-сополимер(молочной и гликолевой кислот) или поликапролактон. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы полимер был биоразлагаемым. Таким образом, в данных вариантах осуществления предпочтительно, что если полимер включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль) или его элементарное звено, то полимер включает блок-сополимер простого полиэфира и биоразлагаемого полимера с тем, чтобы полимер был биоразлагаемым. В других вариантах осуществления полимер сам по себе не включает простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль). В других вариантах осуществления полимер не включает лишь простой полиэфир, такой как поли(этиленгликоль).

Ниже в качестве примера приведены реакции, которые не подразумеваются как ограничивающие. Иммуномодулирующее средство со связывающей иммуномодулирующее средство частью согласно одной из приведенных в качестве примера реакций.

#### Способ 1.

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

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

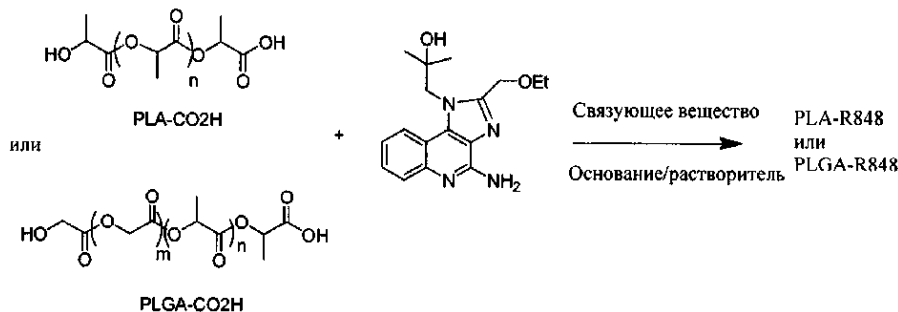


Активирующие реагенты, которые могут быть использованы для превращения полимеров или их элементарных звеньев, таких как PLA или PLGA, в активированную ацилированную форму, включают, но без ограничений, циануровый фторид, N,N-тетраметилфторформамидингексафторфосфат (TFFH); ацилимидазолы, такие как карбонилдиимидазол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

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

## Способ 2.

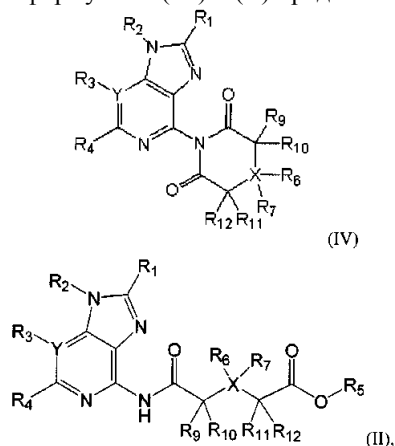
Полимер или его элементарное звено (например, PLA, PLGA, имеющие любой пригодный молекулярный вес) с кислотной концевой группой вступают в реакцию с иммуномодулирующим средством (например, R848) в присутствии активирующего или связывающего реагента, который превращает полимер или его элементарное звено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



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

## Способ 3.

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

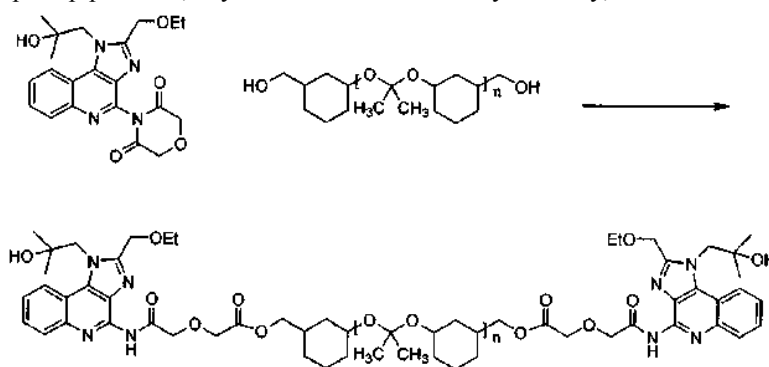


где R<sub>1</sub>=H, OH, SH, NH<sub>2</sub> или замещенный или незамещенный алкил, алкокси, алкилтио или алкиламино;

$R_2=H$ , алкил или замещенный алкил;  $Y=N$  или  $C$ ;  $R_3$  отсутствует, если  $Y=N$ ; или представляет собой  $H$ , алкил, замещенный алкил, или объединен с  $R_4$  с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены, если  $Y=C$ ;  $R_4$  представляет собой  $H$  или замещенный или незамещенный алкил, алкокси, алкилтио или алкиламино, если не объединен с  $R_3$  с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами пиридинового кольца, к которому они присоединены; или объединен с  $R_3$  с образованием углеродного кольца или гетероцикла с атомами углерода пиридинового кольца, к которому они присоединены;  $R_5$  представляет собой полимер или его элементарное звено;  $X$  представляет собой  $C$ ,  $N$ ,  $O$  или  $S$ ; каждый из  $R_6$  и  $R_7$  независимо представляет собой  $H$  или замещен; и каждый из  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  и  $R_{12}$  независимо представляет собой  $H$ , галоген,  $OH$ , тио,  $NH_2$  или замещенный или незамещенный алкил, арил, гетероцикл, алкокси, арилокси, алкилтио, арилтио, алкиламино или ариламино.

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

Конкретный пример реакции, осуществляемой по такому способу, показан ниже:

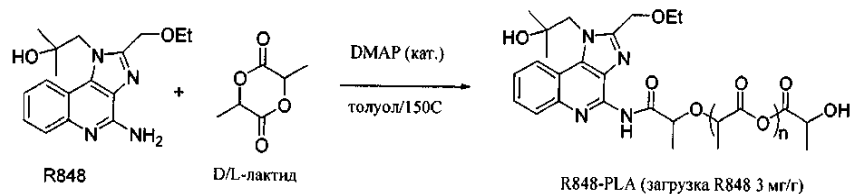


где  $R_5-OH$  содержит две гидроксильных группы (например, диол,  $HO-R_5-OH$ ), каждая из которых функционализована при помощи реакции с имидом, связанным с R848. В некоторых случаях  $HO-R_5-OH$  представляет собой полидиол, такой как поли(гексаметилкарбонат)диол или поликапролактондиол.

В вариантах осуществления, в которых задействован полидиол, одна из групп диола может быть защищена защитной группой (например, t-бутилоксикарбонил), таким образом полидиолом может быть соединение с формулой  $HO-R_5-OP$ , в которой  $P$  является защитной группой. После реакции с иммуномодулирующим средством с образованием конъюгата иммуномодулирующее средство- $R_5-OP$ , защитная группа может быть удалена, и может быть введена в реакцию вторая группа диола с любым подходящим реагентом (например, PLGA, PLA).

Способ 4.

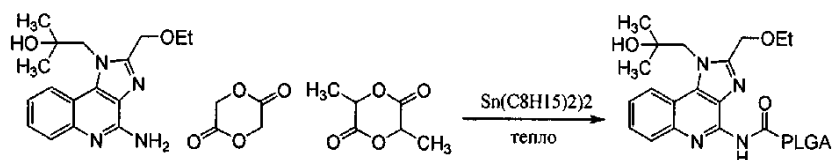
Конъюгат (например, R848-PLA) может быть образован посредством проводимой в одном сосуде полимеризации с раскрытием кольца иммуномодулирующего средства (например, R848) с полимером или его элементарным звеном (например, D/L-лактид) в присутствии катализатора, например, как показано в следующей схеме:



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

Способ 5.

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



Полимеры или их элементарные звенья могут быть сначала объединены и в некоторых случаях нагреты (например, до 135°C) с образованием раствора. В раствор, содержащий полимеры или их элементарные звенья, могут быть добавлены иммуномодулирующее средство с последующим добавлением катализатора (например, этилгексаноата олова). Полученный в результате конъюгат может быть выделен при помощи общеизвестных методик. Неограничивающие примеры подходящих катализаторов включают DMAP и этилгексаноат олова.

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

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания ковалентно связаны с полимерной матрицей. В некоторых вариантах осуществления ковалентное соединение опосредовано линкером. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания нековалентно связаны с полимерной матрицей. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания могут быть инкапсулированы внутри, окружить и/или диспергировать по полимерной матрице. Альтернативно или дополнительно, иммуномодулирующее средство, антиген и/или часть нацеливания могут быть связаны с полимерной матрицей гидрофобными взаимодействиями, взаимодействиями зарядов, силами Ванн-дер-Ваальса и т.д. В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы включают одну или несколько полимерных матриц. В некоторых вариантах осуществления такая полимерная матрица может быть окружена покрывающим слоем (например, липосома, липидный монослой, мицелла и т.д.). В некоторых вариантах осуществления различные элементы синтетических наночастиц могут быть связаны с полимерной матрицей.

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

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

Примеры полимеров, подходящих для применения в данном изобретении, включают без ограничения полиэтилены, поликарбонаты (например, поли(1,3-диоксан-2он)), полиангидриды (например, поли(себациновый ангидрид)), полигидроксикислоты (например, поли(β-гидроксиалканоксид)), полипропилфумераты, поликапролактоны, полиамиды (например, поликапролактан), полиацетали, простые полиэфиры, сложные полиэфиры (например, полилактид, полигликолид), сложные полиэфиры ортокислот,

полицианоакрилаты, поливиниловые спирты, полиуретаны, полифосфазены, полиакрилаты, полиметакрилаты, полимочевины, полистиролы, полиамины и полисахариды (например, хитозан).

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут быть одним или несколькими акриловыми полимерами. В определенных вариантах осуществления акриловые полимеры включают, например, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, этоксиэтилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, сополимер аминоксилметакрилата, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), сополимер алкиламида метакриловой кислоты, поли(метилметакрилат), поли(метакриловой кислоты ангидрид), метилметакрилат, полиметакрилат, сополимер поли(метилметакрилата), полиакриламид, сополимер аминоксилметакрилата, сополимеры глицидилме-

такрилата, полицианакрилаты и комбинации, включающие один или несколько из вышеприведенных полимеров. Акриловый полимер может включать полностью полимеризованные сополимеры сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот с низким содержанием групп четвертичного аммония.

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления синтетические наночастицы могут необязательно содержать один или более амфифильных объектов. В некоторых вариантах осуществления амфифильный объект может способствовать получению синтетических наночастиц с повышенной стабильностью, улучшенной однородностью или повышенной вязкостью. В некоторых вариантах осуществления амфифильные объекты могут быть присоединены к внутренней поверхности липидной мембраны (например, липидного бислоя, липидного монослоя и т.д.). Многие амфифильные объекты, известные в данном уровне техники, подходят для применения при создании синтетических наночастиц в соответствии с данным изобретением. Такие амфифильные объекты включают без ограничения фосфоглицериды; фосфатидилхолины; дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC); диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE); диолеилоксипропилтриэтиламмоний (DOTMA); диолеилфосфатидилхолин, холестерин, сложные эфиры холестерина; диацилглицерол; диацилглицеролсукцинат; дифосфатидилглицерин (DPPG); гексанодеканол, жирные спирты, такие как полиэтиленгликоль (PEG); полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир, поверхностно-активные жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота или олеиновая кислота, жирные кислоты, моноглицериды жирных кислот, диглицериды жирных кислот, амиды жирных кислот; сорбитантриолеат (Span®85) гликохолат; сорбитанмонолаурат (Span®20); полисорбат 20 (Tween®20); полисорбат 60 (Tween®60); полисорбат 65 (Tween®65); полисорбат 80 (Tween®80); полисорбат 85 (Tween®85); полиоксиэтилена моностеарат; суфрактин; полуксомер; сорбитановый сложный эфир жирной кислоты, такой как сорбитантриолеат, лецитин; лизолецитин; фосфатидилсерин; фосфатидилинози-

тол; сфингомиелин; фосфатидилэтаноламин (цефалин); кардиолипин; фосфатидная кислота; цереброзиды; дицетилфосфат; дипальмитоилфосфатидилглицерол; стеариламин; додециламин; гексадециламин, ацетилпальмитат; глицеринрицинолеат; гексадецилстеарат; изопропилмиристат; тилоксапол; поли(этиленгликоль) 5000-фосфатидилэтаноламин; поли(этиленгликоль) 400-моностеарат; фосфолипиды, синтетические и/или природные моющие средства, имеющие высокие поверхностно-активные свойства; деоксихолаты; циклодекстрины; хаотропные соли; средства ионного спаривания, а также их комбинации. Компонент амфифильного объекта может быть смесью различных амфифильных объектов. Специалистам в данном уровне техники будет понятно, что это примерный, не являющийся исчерпывающим, перечень веществ с поверхностно-активным действием. Любое амфифильное средство может быть использовано при создании синтетических наноносителей, которые будут применены в соответствии с данным изобретением.

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

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

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

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

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

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

линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер является полиалкильным линкером. В определенных вариантах осуществления линкер является линкером простых полиэфиров. В определенных вариантах осуществления линкер является полиэтиленовым линкером. В определенных специфических вариантах осуществления линкер является полиэтиленгликольным (PEG) линкером.

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

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

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

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

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

Фармацевтические композиции и способы применения.

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

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

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

Композиции и способы, описываемые в данном документе, могут быть применены для индукции, усиления, стимуляции, модуляции или управления иммунным ответом. Композиции и способы, описываемые в данном документе, можно применять для диагностики, профилактики и/или лечения состояний, таких как разновидности рака, инфекционные заболевания, метболические расстройства, дегенеративные заболевания, воспалительные заболевания, иммунологические заболевания, или других расстройств и/или состояний. Композиции и способы, описываемые в данном документе, также могут быть применены



ны для профилактики или лечения привыкания, например привыкания к никотину или наркотическому веществу. Композиции и способы, описываемые в данном документе, также могут быть применены для профилактики и/или лечения состояния, возникшего в результате воздействия токсина, вредного вещества, токсина окружающей среды или другого токсичного вещества.

### Примеры

Пример 1. Получение активированного полимера.

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

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

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

Пример 2. Получение активированного полимера.

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

Пример 3. Получение активированного полимера.

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

Пример 4. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

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

Пример 5. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

PLA-NHS (1,0 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.), R848 (132 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.), DIPEA (0,15 мл, 0,84 ммоль, 4,0 экв.) и DMAP (25 мг, 0,21 ммоль, 1,0 экв.) растворили в 2 мл сухого DMF в атмосфере аргона. Полученный в результате раствор нагревали при 50-60°C в течение 2 дней. Раствор охладили до КТ и добавили к 40 мл деионизированной (DI) воды для осаждения полимерного продукта. Затем полимер промыли DI водой (40 мл) и простым эфиром (2×40 мл) и высушили при 30°C под вакуумом с получением конъюгата PLA-R848 в виде белого пенистого твердого вещества (0,7 г, 20 мг полимера гидролизвали в растворе из 0,2 мл THF, 0,1 мл MeOH и 0,1 мл 15% NaOH. Количество R848 на полимере, как опре-

делили, составило приблизительно 35 мг/г согласно обращенно-фазовому ВЭЖХ-анализу (колонка C18, подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза В: 0,1% TFA в CH<sub>3</sub>CN, градиент).

Пример 6. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

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

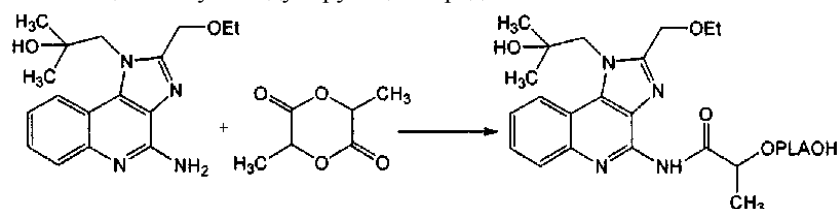
Пример 7. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

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

Пример 8. Конъюгация иммуномодулирующего средства.

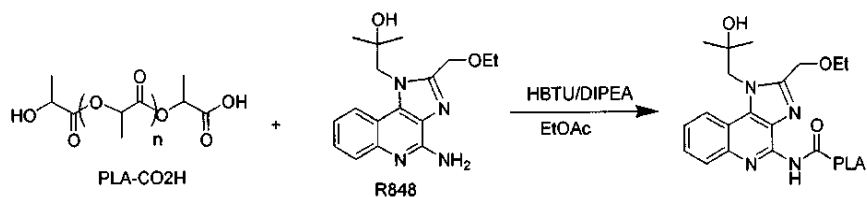
PLA (R202H) (1,0 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.), EDC (161 мг, 0,84 ммоль, 4,0 экв.), HOBT·H<sub>2</sub>O (65 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.), R848 (132 мг, 0,42 ммоль, 2,0 экв.) и DIPEA (0,150 мл, 0,84 ммоль, 4,0 экв.) растворили в 2 мл сухого DMF. Смесь нагревали при 50-55°C в течение 2 дней. Раствор охладили до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

Пример 9. Конъюгация иммуномодулирующего средства



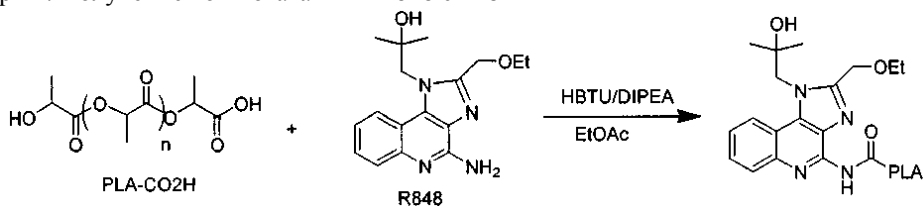
В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резинквимод (R-848, 218 мг,  $6,93 \times 10^{-4}$  моль), D/L лактид (1,0 г,  $6,93 \times 10^{-3}$  моль) и безводный сульфат натрия (800 мг). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре 55°C в течение 8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

Пример 10. Получение конъюгата PLA-R848 с низким MB



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

Пример 11. Получение конъюгата PLA-R848 с низким МВ



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

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

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

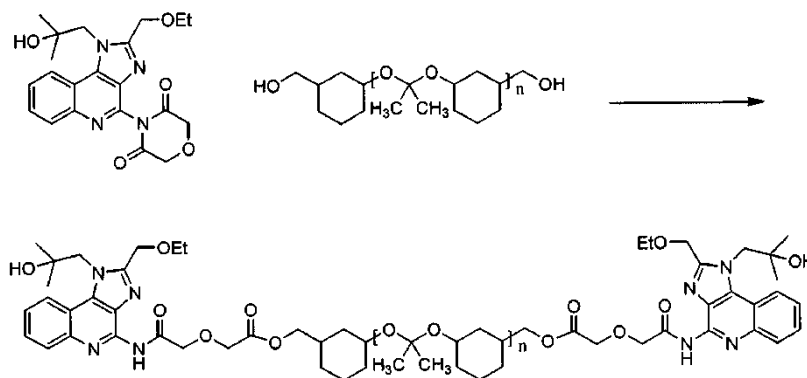
PCADK синтезируют в 50 мл колбе с двумя горлышками, соединенной с короткой дистиляционной головкой. Сначала 5,5 мг перекристаллизованной *p*-толуолсульфоновой кислоты (0,029 ммоль, Aldrich, Сент-Луис, Миссури) растворяют в 6,82 мл этилацетата и добавили к 30 мл раствора бензола (поддерживая 100°C), который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

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

Этап 1. Получение PCADK



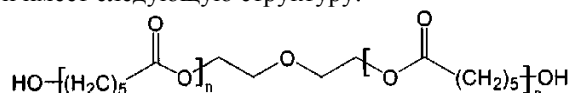
Этап 2. Конъюгация PCADK к R848



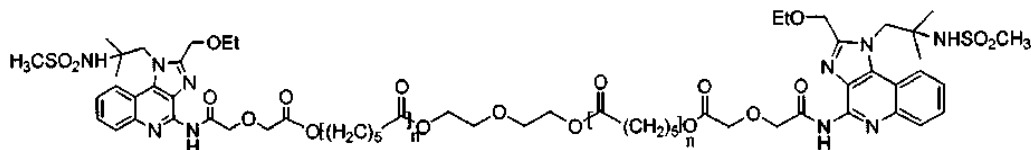
На этапе 2 полимер из этапа 1 (12 г,  $2,0 \times 10^{-3}$  моль) растворяют в 100 мл метиленхлорида и добавляют лактам R848 (3,3 г,  $8,0 \times 10^{-3}$  моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабисцикло-[4,4,0]дец-5-ен (TBD, 0,835 г,  $6 \times 10^{-3}$  моль) одной порцией. После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

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

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



Конъюгат поликапролактондиол-R854 имеет следующую структуру:



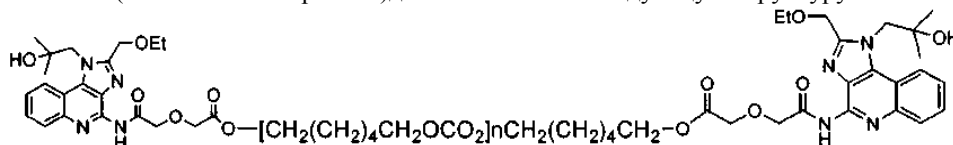
Полимер (5 г,  $2,5 \times 10^{-3}$  моль) растворяют в 25 мл метиленхлорида и добавляют лактам R854 (2,4 г,  $5,0 \times 10^{-3}$  моль). Эту взвесь перемешивают по мере добавления 1,5,7-триазабисцикло-[4,4,0]дец-5-ена (TBD, 0,557 г,  $4 \times 10^{-3}$  моль) одной порцией. После перемешивания при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

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

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



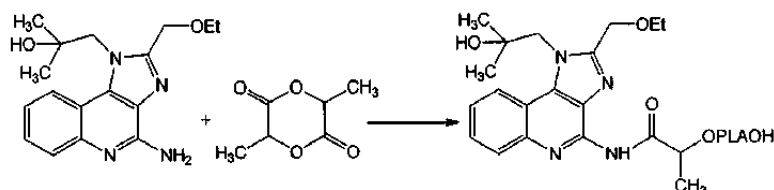
Конъюгат поли(гексаметиленкарбонат)диол-R848 имеет следующую структуру:



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

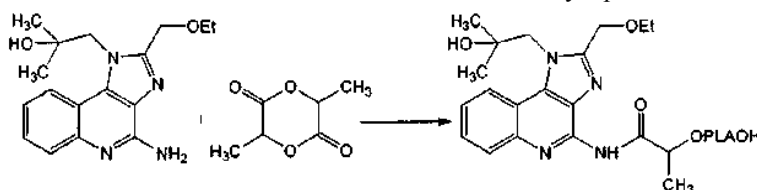
21%.

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



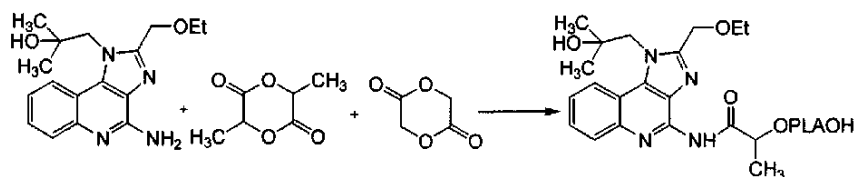
В двугорлую круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин резиквимод (R-848, 100 мг,  $3,18 \times 10^{-4}$  моль), D/L лактид (5,6 г,  $3,89 \times 10^{-2}$  моль) и безводный сульфат натрия (4,0 г). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре  $50^\circ\text{C}$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

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



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

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



В круглодонную колбу, оснащенную мешалкой и конденсатором, добавили имидазохинолин, резиквимод (R-848, 436 мг,  $1,39 \times 10^{-3}$  моль), гликолид (402 мг,  $3,46 \times 10^{-3}$  моль), D/L лактид (2,0 г,  $1,39 \times 10^{-2}$  моль) и безводный сульфат натрия (1,6 г). Колбу и содержимое сушили под вакуумом при температуре

55°C в течение 8 ч. После охлаждения колбу затем продули аргоном и добавили толуол (60 мл). Реакционную смесь перемешивали на масляной бане, установленной на 120°C, пока не растворился весь R848, гликолид и лактид, а затем добавили пипеткой этилгексаноат олова (50 мг, 39 мкл). Нагревание продолжали в атмосфере аргона в течение 16 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавили этилацетатом (200 мл) и затем раствор промыли водой (200 мл). Раствор высушили над сульфатом магния, отфильтровали и выпарили под вакуумом с получением неочищенного конъюгата PLGA-R-848. Неочищенный полимер подвергли хроматографии на силикагеле с использованием 10% метанола в метиленхлориде в качестве элюента. Фракции, содержащие конъюгат, объединили и выпарили с получением очищенного конъюгата. Его высушили в высоком вакууме с получением конъюгата в виде твердой пены с выходом 1,55 г (54,6%). Посредством интегрирования ЯМР-сигналов для ароматических протонов хинолина и их сравнения с интегральной интенсивностью протона СН молочной кислоты было определено, что молекулярный вес конъюгата составлял приблизительно 2 КДа. ГПХ показала, что конъюгат не содержал поддающийся обнаружению свободный R848.

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

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

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

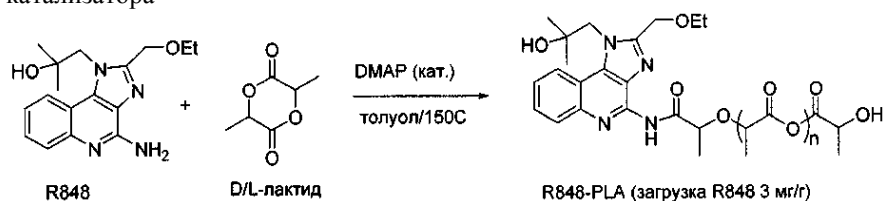
PLA (D/L-полилактид) с MB 5000 (10,5 г, 2,1 ммоль, 1,0 экв.) растворяют в дихлорметане (DCM) (35 мл). Добавляют EDC (2,0 г, 10,5 ммоль, 5 экв.) и NHS (1,2 г, 10,5 ммоль, 5 экв.). Полученный в результате раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 3 дней. Раствор концентрируют для удаления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

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

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

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

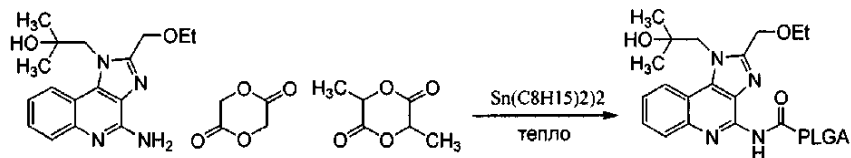
Пример 21. Проводимая в одном сосуде полимеризация с раскрытием кольца R848 с D/L-лактидом в присутствии катализатора



Смесь из R848 (0,2 ммоль, 63 мг), D/L-лактида (40 ммоль, 5,8 г) и 4-диметиламинопиридина

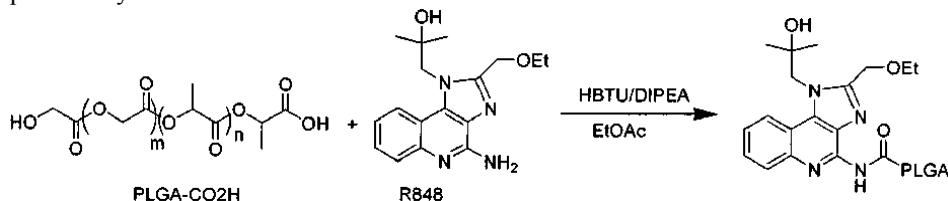
(DMAP) (50 мг, 0,4 ммоль) в 2 мл безводного толуола медленно нагрели до 150°C (температура масляной бани) и поддерживали при этой температуре в течение 18 ч (через 3 ч не осталось R848). Смесь охладили до окружающей температуры и в полученной смеси остановили реакцию водой (50 мл) с осаждением полученного полимера, R848-PLA. Полимер затем промыли последовательно 45 мл каждого из MeOH, iPrOH и этилового простого эфира. Полимер высушили под вакуумом при 30°C с получением грязно-белого рыхлого твердого вещества (5,0 г). Полимерную структуру подтвердили посредством  $^1\text{H}$  ЯМР в  $\text{CDCl}_3$ . Небольшой образец полимера обработали 2Н водным NaOH в THF/MeOH для определения загрузки R848 на полимере с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Загрузка R848 составляет 3 мг на грамм полимера (0,3% загрузка - 27,5% от теории).

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



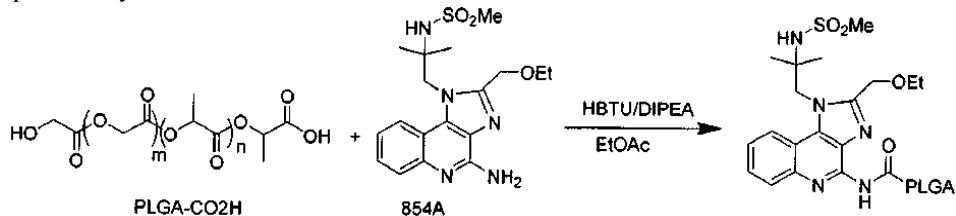
Смесь D/L-лактида (10,8 г, 0,075 моль) и гликолида (2,9 г, 0,025 моль) нагрели до 135°C в атмосфере аргона. После расплавления всех материалов и получения прозрачного раствора добавили R848 (1,08 г,  $3,43 \times 10^{-3}$  моль). Данный раствор перемешивали при 135°C под медленным потоком аргона в течение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

Пример 23. Получение конъюгата PLGA-R848



Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 10 г, 7,0 ммоль) и HBTU (5,3 г, 14 ммоль) в безводном EtOAc (160 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 50 мин. Добавили соединение R848 (2,2 г, 7 ммоль) с последующим диизопропилэтиламином (DIPEA) (5 мл, 28 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение ночи (приблизительно 16 ч). После охлаждения смесь разбавили EtOAc (200 мл) и промыли насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2×40 мл), водой (40 мл) и концентрированным соляным раствором (40 мл). Раствор высушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (20 г) и сконцентрировали в гелеподобный остаток. Затем добавили изопропиловый спирт (IPA) (300 мл) и конъюгат полимера осадил из раствора. Затем полимер промыли IPA (4×50 мл) для удаления остаточных реагентов и высушили под вакуумом при 35-40°C в течение 3 дней в виде белого порошка (10,26 г, MB по ГПХ составляет 5200, загрузка R848 составляет 12% по ВЭЖХ).

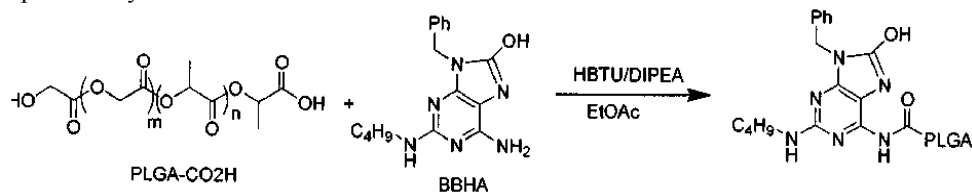
Пример 24. Получение конъюгата PLGA-854A



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

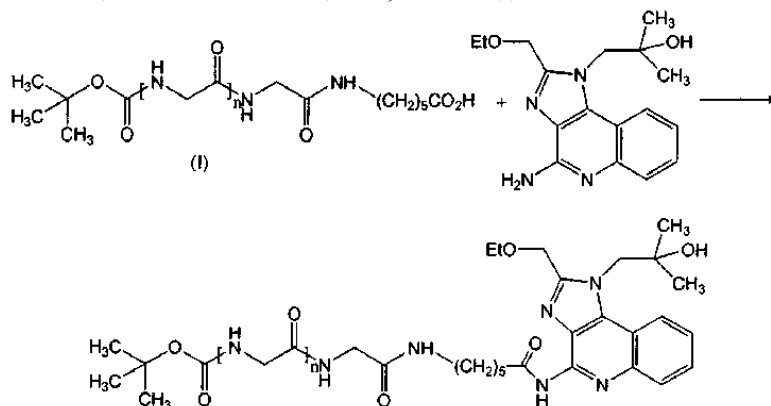
40°C в течение 2 дней в виде белого порошка (1,21 г, МВ по ГПХ составляет 4900, загрузка 854А составляет 14% по ВЭЖХ).

Пример 25. Получение конъюгата PLGA-BBNA



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

Пример 26. Конъюгация R848 с полиглицином, полиамид



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

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

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

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

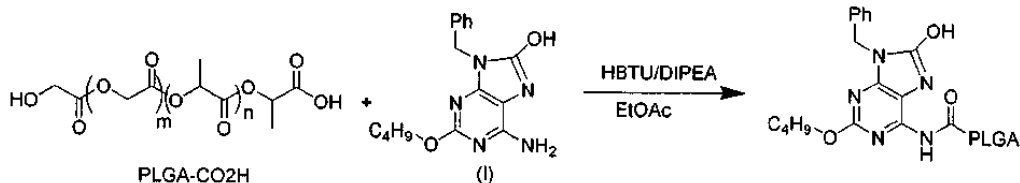
Этап 1. Конъюгат полиглицин/R848, защищенный t-BOC, (5 г) растворяют в трифторуксусной кислоте (25 мл) и этот раствор нагревают при 50°C в течение одного часа. После охлаждения трифторуксусную кислоту удаляют под вакуумом и остаток растирают в порошок в этилацетате (25 мл). Полимер выделяют фильтрацией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

Этап 2. Смесь из PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 10 г, 7,0 ммоль) и HBTU (5,3 г, 14 ммоль) в безводном DMF (100 мл) перемешивают при КТ в атмосфере аргона в течение 50 мин. Добавляют полимер из приведенного выше (1,4 г, 7 ммоль), растворенный в



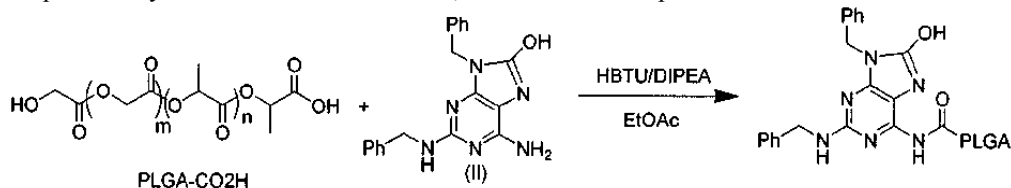
сухом DMF (20 мл), с последующим диизопропилэтиламино (DIPEA) (5 мл, 28 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 6 ч и затем при 50-55°C в течение ночи (16 ч). После охлаждения DMF выпаривают под вакуумом и остаток растворяют в метилхлориде (50 мл). Полимер осаждают посредством добавления 2-пропанола (200 мл). Полимер выделяют при помощи декантирования и промывают 2-пропанолом (4×50 мл) для удаления остаточных реагентов и высушивают под вакуумом при 35-40°C в течение ночи. Получают 9,8 г (86%) блок-сополимера.

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



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

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



Смесь PLGA (Lakeshores Polymers, MB ~5000, 7525DLG1A, кислотное число 0,7 ммоль/г, 1,0 г, 7,0 ммоль) и HBTU (0,8 г, 2,1 ммоль) в безводном EtOAc (30 мл) перемешивают при КТ в атмосфере аргона в течение 30 мин. Добавляют соединение (II) (0,24 г, 0,7 ммоль) в 2 мл сухого DMSO с последующим диизопропилэтиламино (DIPEA) (0,73 мл, 4,2 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 20 ч. Добавляют дополнительные количества HBTU (0,53 г, 1,4 ммоль) и DIPEA (0,5 мл, 2,8 ммоль) и смесь нагревают при 50-55°C в течение 4 ч. После охлаждения смесь разбавляют EtOAc (100 мл) и промывают насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 мл), водой (2×20 мл) и соляным раствором (20 мл). Раствор высушивают над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (10 г) и концентрируют в гелеподобный остаток. Затем добавляют изопропиловый спирт (IPA) (35 мл) и из раствора осаждают коричневатый конъюгат полимера. Затем полимер промывают IPA (2×20 мл) для удаления остаточных реагентов и сушат под вакуумом при 35-40°C в течение 2 дней в виде коричневатого порошка (1,2 г).

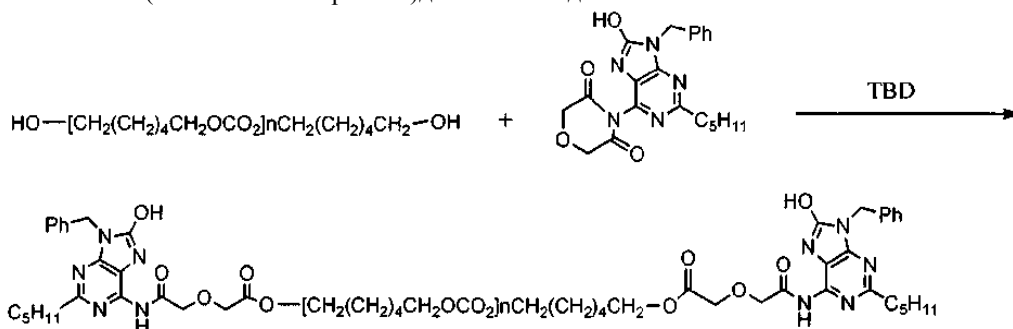
Пример 30. Раскрытие имидного кольца, применяемое для присоединения 2-пентил-8-гидрокси-9-бензиладенина к концевым спиртовым группам поли(гексаметиленкарбонат)диола с молекулярным весом 2000.

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

Поли(гексаметиленкарбонат)диол



Конъюгат поли(гексаметиленкарбонат)диол-8-оксоаденин



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

Пример 31. Конъюгаты никотин-PEG-PLA.

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

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

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

Пример 32. Состав с синтетическим наноносителем.

Для инкапсулированных составов адъюванта синтезировали резиквимод (также известный как R848) в соответствии с синтезом, приведенным в примере 99 патента США №5389640 Gerster et al.

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

Конъюгат PLA-PEG-никотин получили согласно примеру 31.

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

Вышеприведенные материалы применяли для получения следующих растворов.

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

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

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

Пример 33. Двойная эмульсия с множеством первичных эмульсий.

Материалы.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Раствор 2В. 0,71-IV PLA, 75 мг/мл, и PLA-PEG-никотин, 25 мг/мл, в метиленхлориде. Раствор получали путем приготовления сначала двух отдельных растворов при комнатной температуре: 0,71-IV

PLA, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде и PLA-PEG-никотин, 100 мг/мл, в чистом метиленхлориде. Конечный раствор приготовили путем добавления 3 частей раствора PLA на каждую часть раствора PLA-PEG-никотин.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пример 34. Стандартная двойная эмульсия.

Материалы.

Как приведено в примере 33 выше.

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

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

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

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

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

растворения олигонуклеотида в очищенной воде при комнатной температуре.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пример 35. Определение количества средств.

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

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

Способ для СрG.

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

Способ для аналога никотина.

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

до 200 мкл и проанализировали на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества, присутствовавшего в осадках.

Инкапсулированный свободный R848 в наноносителе.

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

Инкапсулированный CpG в наноносителе.

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

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

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

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

Пример 36. Тестирование скорости высвобождения.

Высвобождение антигена (аналога никотина) и иммуностимулирующего средства (R848) из синтетических наноносителей в фосфатно-солевом буфере (PBS) (100 mM, pH 7,4) и цитратном буфере (100 mM, pH 4,5) при 37°C проводят следующим образом.

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

Общее количество R848 и аналога никотина, присутствующих в наноносителях, сначала оценивают по загрузке R848 и аналога никотина в синтетических наноносителях. Водную суспензию тестируемых синтетических наноносителей затем разводят PBS до конечного объема исходного раствора 4,4 мл.

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

Для образца T0 сразу удаляют аликвоту 200 мкл из каждого образца NC и центрифугируют при 14000 об/мин в микроцентрифужных пробирках с помощью микроцентрифуги (модель: Galaxy 16). Удаляют 100 мкл супернатанта и разводят до 200 мкл подвижной фазой А (МРА) ВЭЖХ и анализируют на предмет количества высвобожденных R848 и аналога никотина на обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для измерений в моменты времени: 9×200 мкл каждого из образцов добавляют в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированных), и добавляют 300 мкл 37°C PBS к каждой из вышеупомянутых аликвот, и образцы немедленно помещают в 37°C термостат. В следующие моменты времени: 2, 12, 24, 48, 96 и 144 ч (для конъюгированного R848) или 2, 12, 16 и 24 ч (для неконъюгированного (инкапсулированного) R848), образцы центрифугируют и анализируют на предмет количества высвобожденных R848 и аналога никотина таким же способом, как для образца T0.

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

Для образца T0 удаляют 200 мкл аликвоту из каждого образца и центрифугируют при 6000 об/мин в

течение 20 мин и удаляют супернатант. Остаточные синтетические наночастицы ресуспендируют в 200 мкл цитратного буфера и центрифугируют при 14000 об/мин в течение 15 мин. Удаляют 100 мкл супернатанта, и разводят до 200 мкл посредством МРА, и анализируют на R848 и аналог никотина, как приведено выше.

Для измерений в моменты времени: 9×200 мкл каждого из образцов добавляют в микроцентрифужные пробирки (3×200 для неконъюгированного), и центрифугируют в течение 20 мин при 6000 об/мин, и удаляют супернатанты. Остаточные НС затем ресуспендируют в 500 мкл цитратного буфера и помещают в 37°C термостат. В следующие моменты времени: 12, 24, 48, 96 и 144 ч (для конъюгированного R848) или 2, 12, 16 и 24 ч (для неконъюгированного (инкапсулированного) R848), образцы центрифугируют и анализируют на предмет количества высвобожденных R848 и аналога никотина, как описано выше для образца T0.

Для установления баланса масс из вышеуказанных измерений в PBS и цитратном буфере оставшиеся осадки из каждого образца обрабатывают 200 мкл конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (8М) в течение 3 ч с перемешиванием. После осаждения смеси добавляют 200 мкл 1% TFA с доведением общего объема раствора с осадком до 400 мкл. Аликвоту 50 мкл раствора разводят МРА до 200 мкл и анализируют на ВЭЖХ, как описано выше, для определения количества невысвобожденных R848 и аналога никотина, которые остаются в осадках после высвобождения *in vitro* для сведения баланса масс. Для неконъюгированных образцов разводят образец посредством TFA в ацетонитриле и анализируют, как описано выше для R848 и аналога никотина.

Пример 37. Тестирование скорости высвобождения.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пример 38. Иммунизация посредством NC-Nic, транспортирующих R848.

Группу из пяти мышей иммунизировали три раза (подкожно, в задние конечности) с 2-недельными интервалами (дни 0, 14 и 28) посредством 100 мг NC-Nic. Нанотранспортеры получили посредством

принципа составления, который описан выше, и они содержали пептид ova и полимеры, 50% из которых были PLGA-R848, 25% из которых были PLA, и 25% из которых были PLA-PEG-Nic. Затем измерили антитела к никотину сыворотки крови на 26, 40, 54 и 69 дни. Значения  $EC_{50}$  для антител к никотину, как измерено в стандартном ELISA на полилизинникотин, показаны на фиг. 1.

Скорость высвобождения R848 из NC-Nic составляла 19,8 мкг на 1 мг NC-Nic за 24 ч инкубации при 37°C (pH 4,5). Сходная обработка не дала выявляемого высвобождения PEG-никотинового антигена из NC-Nic. PEG-никотин высвобождался из NC-Nic только при крайних значениях pH (после обработки  $NH_4OH$  или TFA), демонстрируя 5,2% высвобождение (52 мкг на 1 мг NC-Nic).

Данный эксперимент демонстрирует, что использование NC-Nic, транспортирующего R848 (адъювант Th1, агонист TLR7/8), который высвобождался из NC-Nic намного быстрее при физиологических условиях (pH 4,5), чем антиген (PEG-никотин), создает сильный долговременный гуморальный иммунный ответ на антиген, переносимый NC. Индукция антител после иммунизации посредством NC-Nic (на-носоитель, с никотином на внешней поверхности в форме PLA-PEG-никотин) также транспортирующим адъювант R848.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для индукции или усиления иммунного ответа, содержащая синтетические наноносители, которые включают:
  - (a) иммуномодулирующее средство, связанное с синтетическими наноносителями посредством связывающей иммуномодулирующее средство части; и
  - (b) антиген, связанный с синтетическим наноносителем посредством связывающей антиген части, где связывающая часть антигена более стабильна при pH 4,5, чем связывающая часть иммуномодулирующего средства.
2. Композиция по п.1, где иммуномодулирующее средство связано с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномоделирующее средство части ковалентно.
3. Композиция по п.1 или 2, где антиген связан с синтетическим наноносителем посредством связывающей антиген части ковалентно.
4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где антиген представляет собой В-клеточный антиген, где, необязательно, В-клеточный антиген является: (a) антигеном, происходящим от инфекционного агента; или (b) слабоиммуногенным антигеном; или (c) злоупотребляемым веществом или его частью или вызывающим привыкание веществом или его частью; или (d) токсином или средством, вредным для окружающей среды; или (e) аллергеном, антигеном дегенеративного заболевания, раковым антигеном, антигеном атопического заболевания или антигеном заболевания обмена веществ.
5. Композиция по любому из пп.1-3, где антиген представляет собой Т-клеточный антиген, где, необязательно, Т-клеточный антиген является антигеном MHC I класса.
6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуномодулирующее средство является адъювантом.
7. Композиция по п.6, где адъювант включает универсальный Т-клеточный антиген или агонист Toll-подобного рецептора (TLR), где, необязательно, агонист TLR представляет собой: (a) агонист TLR 3, агонист TLR 7, агонист TLR 8, агонист TLR 7/8 или агонист TLR 9; или (b) имидазохинолин, например резиквимод или имиквимод; или (c) иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, например иммуностимулирующую ДНК, иммуностимулирующую РНК или содержащую CpG иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту.
8. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где синтетические наноносители включают один или несколько биоразлагаемых полимеров.
9. Композиция по любому из пп.1-8, где связывающая часть антигена содержит простой полиэфирный линкер.
10. Композиция по любому из пп.1-8, где синтетические наноносители включают несколько биоразлагаемых полимеров.
11. Композиция по п.10, где иммуномодулирующее средство и антиген, каждое, связано через связывающую часть иммуномодулирующего средства и связывающую часть антигена, соответственно, с биоразлагаемым полимером синтетических наноносителей.
12. Композиция по п.11, где биоразлагаемый полимер, с которым связано иммуномодулирующее средство, не включает простой полиэфир.
13. Композиция по п.12, где биоразлагаемый полимер включает полилактид, полигликолид или сополимер полилактида и полигликолида.
14. Композиция по любому из пп.8-13, где биоразлагаемый полимер или полимеры имеют средневесовой молекулярный вес в диапазоне от 800 до 10000 Да, определенный с помощью гель-проникающей хроматографии.
15. Композиция по любому из пп.8-13, где иммуномодулирующее средство связано с одним или несколькими биоразлагаемыми полимерами ковалентно.



16. Композиция по п.15, где связывающая иммуномодулирующее средство часть включает амидную связь, сложноэфирную связь или электростатическую связь.

17. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где синтетические наноносители дополнительно включают функциональный элемент нацеливания на антигенпрезентирующую клетку (APC) и/или включают наночастицы на основе липидов, полимерные наночастицы, металлические наночастицы, эмульсии на основе поверхностно-активных веществ, дендримеры, бакиболлы, нанопроволоки, вирусоподобные частицы, частицы на основе пептида или белка, наночастицы, которые содержат комбинацию наноматериалов, сфероидальные наночастицы, кубические наночастицы, пирамидальные наночастицы, вытянутые наночастицы, цилиндрические наночастицы или тороидальные наночастицы.

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

19. Композиция, содержащая вакцину, которая включает композицию по любому из предшествующих пунктов.

20. Применение композиции по любому из предшествующих пунктов в способе лечения или профилактики, включающем введение композиции субъекту.

21. Применение композиции по п.20 в способе индукции или усиления иммунного ответа, например, при лечении или профилактике рака, инфекционного заболевания, неаутоиммунного нарушения обмена веществ, дегенеративного заболевания или привыкания.

22. Способ индукции или усиления иммунного ответа, включающий определение, что иммуномодулирующее средство и антиген, связанные с синтетическими наноносителями, отделяются от синтетических наноносителей согласно следующему соотношению:

$$IA \text{ (высв.)\%/} A \text{ (высв.)\%} \geq 1,2,$$

где иммуномодулирующее средство связано с синтетическими наноносителями посредством связывающей иммуномодулирующее средство части и антиген связан с синтетическими наноносителями посредством связывающей антиген части; где связывающая антиген часть более стабильна при pH 4,5, чем связывающая иммуномодулирующее средство часть; и

где  $IA \text{ (высв.)\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму веса иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетических наноносителях при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее из образцов синтетических наноносителей; и

где  $A \text{ (высв.)\%}$  определяют как вес антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму веса антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес антигена, удерживаемого в синтетических наноносителях при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее из образцов синтетических наноносителей; и

введение указанных наноносителей субъекту.

23. Способ индукции или усиления иммунного ответа, включающий введение иммуномодулирующего средства и антигена субъекту, где иммуномодулирующее средство и антиген связаны с синтетическими наноносителями и определены как диссоциирующие от синтетических наноносителей согласно следующему соотношению:

$$IA \text{ (высв.)\%/} A \text{ (высв.)\%} \geq 1,2,$$

где иммуномодулирующее средство связано с синтетическим наноносителем посредством связывающей иммуномодулирующее средство части; и антиген связан с синтетическими наноносителями посредством связывающей антиген части; где связывающая антиген часть более стабильна при pH 4,5, чем связывающая иммуномодулирующее средство часть; и

где  $IA \text{ (высв.)\%}$  определяют как вес иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму веса иммуномодулирующего средства, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч плюс вес иммуномодулирующего средства, удерживаемого в синтетических наноносителях при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и взятый как среднее из образцов синтетических наноносителей; и

где  $A \text{ (высв.)\%}$  определяют как вес антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, деленный на сумму веса антигена, высвобождаемого при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, плюс вес антигена, удерживаемого в синтетических наноносителях при воздействии на синтетические наноносители водной средой *in vitro* при pH 4,5 в течение 24 ч, выраженный как весовой процент и

взятый как среднее из образцов синтетических наноносителей.

