

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035898**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.28

(21) Номер заявки
201790773

(22) Дата подачи заявки
2015.10.02

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТВОРИМЫХ БИОМОЛЕКУЛ**

(31) **62/059,628; 62/198,519; 62/198,541**

(32) **2014.10.03; 2015.07.29; 2015.07.29**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/053748**

(87) **WO 2016/054522 2016.04.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НАНОТИКС, ЭЛЭЛСИ (US)

(72) Изобретатель:
Хоторн Луи (US)

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

(56) WO-A2-2004071641
WO-A1-2015112842
WO-A1-2008127515
WO-A2-2005107802
DE-A1-10144251

(57) В изобретении, в частности, предоставлены композиции, которые связывают и ингибируют биологическую активность растворимых биомолекул, а также их фармацевтические композиции. Также в изобретении предоставлен ряд применений (например, терапевтических применений), в которых пригодны композиции.

B1

035898

**035898
B1**

Приоритет

По настоящей патентной заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 62/059628, зарегистрированной 3 октября 2014 г., предварительной патентной заявки США № 62/198519, зарегистрированной 29 июля 2015 г., и предварительной патентной заявки США № 62/198541, зарегистрированной 29 июля 2015 г., каждая из которых, таким образом, полностью включена в качестве ссылки.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Множество лекарственных средств против злокачественных опухолей, доступных клинически или находящихся в разработке, приводят к стимуляции способности иммунной системы распознавать или разрушать злокачественную опухоль или и то, и другое. Три из наиболее известных представляют собой ингибиторы контрольных точек ервой (Yervey) (ипилиумаб) из Bristol-Myers Squibb, кейтруда (Keytruda) (пембролизумаб, ранее известный как ламбролизумаб) из Merck и клеточную терапию, известную как adoptивный перенос клеток с проникающими в опухоль лимфоцитами (ACT/TIL) из Moffitt Cancer Center/National Cancer Institute. Однако эти и другие подходы включают общую активацию иммунной системы индивидуума, индуцируя потенциально опасные симптомы типа аутоиммунных нарушений и/или других значимых побочных эффектов.

В данной области существует необходимость в более эффективных фармакологических подходах для решения проблемы злокачественных опухолей, в частности метастатических злокачественных опухолей, без нарушения способности индивидуума избегать аутоиммунных реакций. В частности, в настоящем описании предоставлены способы и композиции на основе альтернативных подходов к использованию собственной иммунной системы индивидуума против злокачественных опухолей, включая растормаживание микроокружения опухоли, например ослабление защитной системы опухоли, а не стимуляцию иммунных клеток.

Сущность изобретения

В описании, наряду с другими, предоставлены композиции, которые связываются с растворимыми биомолекулами и ингибируют их биологическую активность, а также их фармацевтические композиции. Также в настоящем документе предоставлен ряд применений, для которых пригодны эти композиции. Например, композиции, описываемые в настоящем документе, пригодны для ингибирования пролиферации, роста и/или выживания таких клеток, как злокачественные клетки. В другом примере композиции, описываемые в настоящем документе, могут быть пригодными для связывания и нейтрализации токсинов (например, зоотоксинов, бактериальных токсинов и/или растительных токсинов), вирусов или других чужеродных соединений в кровотоке индивидуума.

"Полипептид", "пептид" и "белок" используют взаимозаменяемо и они означают любую связанную в пептид цепь аминокислот, вне зависимости от длины или посттрансляционных модификаций. Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, как обычно понимает специалист в области, к которой принадлежит настоящее описание. Ниже описаны предпочтительные способы и материалы, хотя в практическом осуществлении или тестировании описываемых в настоящем документе способов и композиций также можно использовать способы и материалы, сходные с теми или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указываемые в настоящем документе, полностью включены в качестве ссылки.

По изобретению предусмотрены все комбинации любых из указанных выше аспектов и вариантов осуществления, а также комбинации с любым из вариантов осуществления, указанных в подробном описании и примерах.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведен иллюстративный вариант осуществления частицы, которая связывается с растворимыми формами рецептора TNF (TNFR). Размер частицы составляет 1 мкм³. Внутренние поверхности частицы содержат иммобилизованный TNF, который способен к связыванию с растворимым TNFR и его изоляции (захвату) от его природных лигандов.

На фиг. 2 приведен иллюстративный вариант осуществления частицы, которая связывается с растворимыми формами рецептора TNF (TNFR). Диаметр кольцеобразной частицы составляет 175 нм. Внутренние поверхности частицы содержат иммобилизованный TNF, который способен к связыванию с растворимым TNFR и его изоляции (захвату) от его природных лигандов.

На фиг. 3 приведен иллюстративный вариант осуществления частиц, которые связываются с растворимыми формами рецептора TNF (TNFR). Частица в левой части чертежа представляет собой октаэдр с сердцевинкой с наибольшим размером от 100 до 150 нм. Частица в правой части чертежа представляет собой икосаэдр с сердцевинкой с наибольшим размером от 200 до 300 нм. Каждая частица дополнительно содержит молекулярные выступы, выходящие наружу из вершин сердцевинки многогранной структуры. Выступы служат в качестве "отражателей клеток", которые препятствуют взаимодействию TNF, связанному с частицей и TNFR на клеточной поверхности.

Подробное описание

Изобретение относится к композициям и способам изоляции растворимых биомолекул от их природного окружения, например, для ингибирования, таким образом, биологической активности раствори-

мых биомолекул. Например, по изобретению предоставлены частица или множество частиц с поверхностью, содержащей средство (например, иммобилизованное на поверхности частицы), которое селективно связывается с растворимой биомолекулой. После связывания растворимой биомолекулы со средством, частица изолирует ее так, что происходит ограничение способности растворимой биомолекулы (например, существенное ограничение способности или отсутствие способности) взаимодействовать с другими природными партнерами по связыванию растворимой биомолекулы. Таким образом, растворимая биомолекула становится инертной.

I. Биомолекула.

Как правило, растворимая биомолекула представляет собой первый участник пары со специфическим связыванием. Как используют в настоящем документе, "партнер по связыванию", "партнер по специфическому связыванию" или "участник пары со специфическим связыванием", как правило, включает любого участника пары участников связывания, которые связываются друг с другом со значительными аффинностью и специфичностью. Пара партнеров по связыванию, помимо прочего, может связываться друг с другом со значительным исключением, по меньшей мере, большинства или, по меньшей мере, по существу всех других компонентов из образца и/или может обладать константой диссоциации менее чем приблизительно 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} или 10^{-8} М. Пара партнеров по связыванию может "соответствовать" друг другу предсказуемым образом, что основано на множестве атомных взаимодействий, совместно увеличивающих специфичность и аффинность. Партнеров по связыванию, наряду с другим, можно получать из биологических систем (например, взаимодействия рецептор-лиганд) на основе химических взаимодействий и/или посредством технологии молекулярного импринтинга. Иллюстративные соответствующие пары партнеров по связыванию, также называемые парами со специфическим связыванием, представлены в табл. 1 с произвольными и взаимозаменяемыми обозначениями "первый" и "второй".

Как используют в настоящем документе, термин "биомолекула" относится к любой молекуле, которая может проявлять свое действие в живом организме. В определенных вариантах осуществления биомолекула представляет собой атом, такой как литий или свинец (например, биомолекула может представлять собой катион металла). В определенных вариантах осуществления биомолекула не является атомом или ионом металла. Например, биомолекула может представлять собой такую молекулу, как органическое соединение или неорганическое соединение. В определенных вариантах осуществления биомолекула представляет собой лекарственное средство, такое как варфарин. Биомолекула может представлять собой психоактивное лекарственное средство, такое как диацетилморфин. Биомолекула может представлять собой отравляющее вещество, токсин или яд. Биомолекула может представлять собой аллерген. Биомолекула может представлять собой канцероген. Биомолекула может представлять собой средство химического оружия, такое как отравляющее средство нервно-паралитического действия. Биомолекула может представлять собой вирус или вирион. Биомолекула может представлять собой молекулу, которая является эндогенной для организма, такую как гормон, цитокин, нейромедиатор, растворимый внеклеточный рецептор, антитело или растворимый белок матрикса. Биомолекула может представлять собой пептид, полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, углевод или сахар. Биомолекула может содержать пептид, полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, углевод или сахар. Биомолекула может представлять собой липид, стероид или холестерин.

Биомолекула может представлять собой лиганд рецептора клеточной поверхности. Лиганд может представлять собой природный лиганд или синтетический лиганд. Лиганд может представлять собой природный лиганд рецептора (например, лиганд, который продуцируется у индивидуума *in vivo*) или неприродный лиганд (например, лиганд, который вводят индивидууму, такой как вирус или лекарственное средство). Биомолекула может представлять собой лиганд цитозольного рецептора или ядерного рецептора.

Таблица 1

Примеры пар со специфическим связыванием

Первый партнер по связыванию	Второй партнер по связыванию
Рецептор клеточной поверхности (например, рецептор TNF)	Природный лиганд (например, TNF α)
Белок капсида или оболочки вируса (например, gp120 ВИЧ-1)	Соответствующий клеточный рецептор (например, CD4)
Токсин ботулизма	Рецептор синаптотатмина II клеточной поверхности
Растворимый рецептор (например, растворимый TNFR или растворимый рецептор IL-2)	Природный лиганд (например, TNF α или IL-2)

Как описано выше, известно, что опухолевые клетки защищают себя от иммунологического надзора хозяина, выделяя в среду растворимые формы рецепторов цитокинов, которые связываются с цитокинами, продуцируемыми иммунными клетками в микроокружении опухоли. Например, злокачественные клетки выделяют в среду растворимые формы рецептора TNF и других рецепторов цитокинов, таких как

рецептор IL-2 и рецептор TRAIL. Эти растворимые рецепторы обеспечивают злокачественным клеткам преимущество в росте, избавляя клетки от проапоптотического действия $TNF\alpha$, IL-2 и TRAIL. В Kagratova et al. опубликовано о выделении злокачественными клетками в среду рецептора ламинина человек 67 кДа, что может усиливать инвазивность и метастазирование опухоли ((1996) J Cell Biochem 60(2):226-234). Таким образом, частицы, описываемые в настоящем документе, можно конструировать для захвата растворимых форм рецепторных белков клеточной поверхности, например, для применения при лечении злокачественной опухоли.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления злокачественная клетка экспрессирует рецепторный белок клеточной поверхности, и/или рецепторный белок клеточной поверхности представляет собой белок, который злокачественная клетка выделяет в среду в виде растворимой формы рецепторного белка клеточной поверхности. В определенных вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности при активации индуцирует апоптоз (например, рецептор смерти). В определенных вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности представляет собой белок рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) (например, TNFR-1 или TNFR-2). В определенных вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности представляет собой рецепторный белок Fas. В определенных вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности представляет собой белок рецептора родственного TNF индуцирующего апоптоз лиганда (TRAILR), белок рецептора 4-1BB, белок CD30, белок рецептора EDA, белок HVEM, белок рецептора лимфотоксина бета, белок DR3 или белок рецептора TWEAK. В определенных вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности представляет собой белок рецептора интерлейкина, например белок рецептора IL-2. Следует понимать, что в таких вариантах осуществления растворимая биомолекула-мишень может представлять собой растворимую форму рецептора клеточной поверхности, например, выделенную в среду злокачественной клеткой.

Также специалисту в данной области понятно, что частицы, описываемые в настоящем документе, также пригодны для захвата широкого спектра растворимых биомолекул, биологическая активность которых может являться, например, нежелательной. Например, частицы можно конструировать для связывания с компонентами вирусных капсидов или оболочек для изоляции, таким образом, вируса от крови индивидуума. В определенных вариантах осуществления частицы можно конструировать для связывания и изоляции токсинов (например, бактериальных токсинов, растительных токсинов и зоотоксинов, таких как один или несколько компонентов змеиного яда) в кровотоке индивидуума. В определенных вариантах осуществления частицы можно конструировать для связывания и изоляции низкомолекулярных соединений (например, запрещенных наркотиков или низкомолекулярных токсинов) от кровотока индивидуума. В таких вариантах осуществления частицы могут быть пригодны для удаления токсинов из организма, например, после укусов змей или насекомых. В определенных вариантах осуществления частицы можно использовать для лечения, предотвращения, задержки начала или снижения тяжести анафилактического шока у индивидуума (например, посредством захвата антигена, вызывающего анафилактический иммунный ответ).

В определенных вариантах осуществления растворимая биомолекула представляет собой вирус, например структурный вирусный белок (такой как белок вирусного капсида или вирусной оболочки), который связывает средство. В таких вариантах осуществления частицы пригодны в качестве противовирусных терапевтических средств, например, для индивидуума, инфицированного вирусом, или с риском инфицирования вирусом.

В определенных вариантах осуществления растворимая биомолекула представляет собой низкомолекулярное соединение или макромолекулу. В определенных вариантах осуществления наибольший размер растворимой биомолекулы составляет не более 600 нм (например, менее 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 или 25 нм). Молекулярный радиус биомолекулы может составлять приблизительно от 1 Å до приблизительно 1 мкм, например, приблизительно от 1 Å до приблизительно 100 нм, приблизительно от 1 Å до приблизительно 20 нм, приблизительно от 1 нм до приблизительно 1 мкм, приблизительно от 1 до приблизительно 100 нм или приблизительно от 1 до приблизительно 20 нм. Молекулярная масса биомолекулы может составлять приблизительно от 3 а.е.м. до приблизительно 10^7 а.е.м., например приблизительно от 100 а.е.м. до приблизительно 10^7 а.е.м., приблизительно от 3 а.е.м. до приблизительно 10^6 а.е.м., приблизительно от 3 а.е.м. до приблизительно 10^5 а.е.м., приблизительно от 100 а.е.м. до приблизительно 10^6 а.е.м. или приблизительно от 400 а.е.м. до приблизительно 10^6 а.е.м.

Как используют в настоящем документе, термины "специфическое связывание", "специфически связывается", "селективное связывание", "селективно связывается" и т.п. грамматические термины относятся к двум молекулам, формирующим комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Как правило, связывание считают специфическим, когда константа ассоциации (k_a) превышает $10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Таким образом, первый участник пары со специфическим связыванием может специфически связываться со вторым участником связывающейся пары с k_a по меньшей мере (или более) 10^6 (например, по меньшей мере или более 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} или более) $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. В определенных вариантах осуществления константа диссоциации (k_d) селективного взаимодей-

ствия является меньшей или равной 10^{-3} (например, 8×10^{-4} , 5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 10^{-4} или 10^{-5}) с^{-1} .

В определенных вариантах осуществления K_D селективного взаимодействия является меньшей 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} М. Константа равновесия K_D представляет собой отношение кинетических констант скоростей реакций - k_d/k_a . В определенных вариантах осуществления K_D селективного взаимодействия составляет менее 1×10^{-9} М.

Как используют в настоящем документе, термин "взаимодействие", при указании взаимодействия между двумя молекулами, относится к физической константе (например, связывания) молекул друг с другом. Как правило, такое взаимодействие приводит к активности (обеспечивающей биологическое действие) одной или обеих из указанных молекул. Ингибирование такого взаимодействия приводит к нарушению активности одной или нескольких молекул, вовлеченных во взаимодействие.

Как используют в настоящем документе, термин "ингибирование" и его грамматические эквиваленты относятся к снижению, ограничению и/или блокированию конкретных действия, функции или взаимодействия. В одном из вариантов осуществления термин относится к снижению уровня данных продукта или параметра до количества (например, фонового уровня взаимодействия между двумя участниками пары со специфическим связыванием), которое составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99% или менее количества в соответствующем контроле. Сниженный уровень данных продукта или параметра не обязательно, хотя и может, означать абсолютное отсутствие продукта или параметра. Изобретение не требует и не ограничено способами, которые полностью устраняют продукт или параметр. Существенное ингибирование может составлять, например, по меньшей мере 50 (например, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более)% ингибирования взаимодействия двух биомолекул (например, первого и второго участников связывающейся пары).

Способы детекции взаимодействия или определения аффинности одной биомолекулы к другой известны в данной области. Например, связывание двух биомолекул можно детектировать и/или количественно определять рядом способов в качестве неограничивающих примеров, таких как интерферометрия биослоев (BLI), вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, способ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализы AlphaScreen® или AlphaLISA® или способы на основе масс-спектрометрии.

В определенных вариантах осуществления связывание можно анализировать с использованием любых анализов на основе SPR, известных в данной области для определения характеристик кинетических параметров взаимодействия двух биомолекул. В способах, описываемых в настоящем документе, можно использовать любое коммерчески доступное устройство SPR, включая в качестве неограничивающих примеров устройства BIAcore (Biacore AB; Uppsala, Sweden); устройства IAsys (аффинность Sensors; Franklin, Massachusetts); систему IBIS (Windsor Scientific Limited; Berks, UK), системы SPR-CELLIA (Nippon Laser and Electronics Lab; Hokkaido, Japan) и детектор SPR Spreeta (Texas Instruments; Dallas, Texas); см., например, Mullett et al. (2000) *Methods* 22: 77-91; Dong et al. (2002) *Reviews in Mol. Biotech.* 82: 303-323; Fivash et al. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 97-101 и Rich et al. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 54-61.

В определенных вариантах осуществления биомолекулярные взаимодействия между двумя биомолекулами с использованием BLI на Octet (ForteBio Inc.). BLI представляет собой оптический аналитический способ без применения меток, в котором определяют связывание лиганда, иммобилизованного на кончике биосенсора, и анализируемого вещества в растворе, измеряя изменения плотности слоя белка на кончике биосенсора в реальном времени.

В определенных вариантах осуществления для характеристики связывания двух биомолекул можно использовать анализы AlphaScreen (PerkinElmer). Аббревиатура ALPHA означает гомогенный анализ усиления люминесценции при сближении. AlphaScreen представляет собой анализ сближения на основе гранул, в котором определяют связывание молекул, связанных с донорными и акцепторными гранулами, измеряя сигнал, продуцируемый при переносе энергии между донорными и акцепторными гранулами. (см., например, Eglen et al. (2008) *Curr. Chem. Genomics* 1:2-10).

В определенных вариантах осуществления для характеристики связывания двух биомолекул можно использовать анализы AlphaLISA® (PerkinElmer). AlphaLISA представляет собой модифицированную форму анализа AlphaScreen, описанного выше, включающую содержащие европий акцепторные гранулы и функционирующий в качестве альтернативы традиционным анализам ELISA (см., например, Eglen et al. (2008) *Curr. Chem. Genomics* 1:2-10).

Можно использовать ряд способов иммунологического анализа, включая конкурентные и неконкурентные иммунологические анализы. Термин "иммунологический анализ" включает способы, без ограничения включающие проточную цитометрию, FACS, иммуноферментные анализы (EIA), такие как способ иммунологического анализа с ферментативным усилением (EMIT), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), ELISA с захватом антител IgM (MAC ELISA) и иммуноферментный анализ на микрочастицах (MEIA), кроме того иммунологические анализы с капиллярным электрофорезом (CEIA), радиоиммунологические анализы (RIA), количественный радиоиммунный анализ (IRMA), иммунологические анализы поляризации флуоресценции (FPIA) и анализы хемилюминесценции (CL). При желании,

такие иммунологические анализы можно автоматизировать.

Иммунологические анализы также можно использовать в сочетании с индуцируемой лазером флуоресценцией. Также для использования по настоящему изобретению пригодны липосомные иммунологические анализы, такие как проточно-инъекционные липосомные иммунологические анализы и липосомные иммуносенсоры. Кроме того, для использования в способах по настоящему изобретению пригодны нефелометрические анализы, в которых, например, формирование комплексов биомолекул приводит к увеличенному светорассеянию, которое преобразуется в максимум интенсивности сигнала как функцию концентрации маркера. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения продукты инкубации детектируют посредством ELISA, RIA, иммунофлуоресцентного анализа (FIA) или иммунологического анализа растворимых частиц (SPIA).

В определенных вариантах осуществления связывание двух биомолекул можно оценивать способами термоденатурации, включающими дифференциальную сканирующую флуориметрию (DSF) и дифференциальное статическое светорассеяние (DSLIS).

В определенных вариантах осуществления связывание двух биомолекул можно оценивать способами на основе масс-спектрометрии в качестве неограничивающих примеров, такими как платформа для аффинной селекции, сопряженной с масс-спектрометрией (AS-MS). Она представляет собой способ без использования метки, где инкубируют белок и тестируемое соединение, несвязанные молекулы отмывают и комплексы белок-лиганд анализируют посредством MS с идентификацией лиганда после этапа разрушения комплексов.

В определенных вариантах осуществления связывание двух биомолекул можно количественно определять с использованием, например, меченных детектируемой меткой белков, таких как радиоактивно меченные (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченные (например, FITC) или ферментативно меченные биомолекулы, посредством иммунологического анализа или посредством хроматографической детекции.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению анализов поляризации флуоресценции и анализов резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при определении, прямым или непрямым способом, степени взаимодействия двух биомолекул.

II. Частицы.

Как используют в настоящем документе, термин "частица" относится к небольшой массе, которая может содержать определенное количество материала, такого как оксид алюминия, металл (например, золото или платина), стекло, диоксид кремния, латекс, пластик, агароза, полиакриламид, метакрилат или любой полимерный материал, и может обладать любым размером и формой. В определенных вариантах осуществления частица или частицы содержат силикон; см., например, публикации международных патентных заявок №№ WO 2013/011764, WO 2013/029278 и WO 2014/151381 и публикацию патентной заявки США № 2014/0271886, описание каждой из которых полностью включено в качестве ссылки. В определенных вариантах осуществления частицы могут содержать крахмал или состоят из него (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 2010/084088).

Также по настоящему документу предоставлены системы частиц. В определенных вариантах осуществления множество частиц обладает узкой или широкой полидисперсностью. Как используют в настоящем документе, "полидисперсность" относится к диапазону размеров частиц в конкретной группе частиц. Т.е. экстремально полидисперсная популяция может содержать частицы со средним размером, например, 1 мкм с отдельными частицами в диапазоне от 0,1 до 4 мкм. В определенных вариантах осуществления предпочтительна "узкая полидисперсность". Т.е. при данном конкретном среднем размере частиц по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы отдельные частицы во множестве частиц отличались не более чем на $\pm 20\%$, предпочтительно не более чем на $\pm 15\%$, а наиболее предпочтительно в настоящий момент не более чем на $\pm 10\%$ от среднего размера частиц. Более конкретно, средний размер частиц в множестве частиц предпочтительно составляет приблизительно 1 мкм или менее. Таким образом, если выбран средний размер частицы 1 мкм, отдельные частицы в множестве наиболее предпочтительно находятся в диапазоне приблизительно от 0,8 до приблизительно 1,2 мкм. В определенных вариантах осуществления средний размер частиц в множестве частиц составляет приблизительно от 0,3 до приблизительно 1 мкм, например приблизительно от 0,4 до приблизительно 0,9, приблизительно от 0,5 до приблизительно 0,9, приблизительно от 0,4 до приблизительно 0,8, приблизительно от 0,5 до приблизительно 0,7, приблизительно от 0,3 до приблизительно 0,9 или приблизительно от 0,3 до приблизительно 0,7 мкм.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к группе или множеству частиц с определенным средним размером частиц. Как используют в настоящем документе, "средний размер частиц" получают, измеряя размер отдельных частиц, а затем деля на общее количество частиц. Определение среднего размера частиц хорошо известно в данной области. Как правило, наибольший средний размер частиц составляет не более 1 мкм. В определенных вариантах осуществления частицы представляют собой наночастицы. В определенных вариантах осуществления наибольший средний размер частиц составляет не более 900 (например, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 450, 400, 350, 300, 250,

200 или 150) нм. В определенных вариантах осуществления частицам приданы форма и размер для циркуляции в крови или сосудистой системе (например, артериях, венах и капиллярах) индивидуума (например, человека). Схемы иллюстративных частиц приведены на фиг. 1-3.

В определенных вариантах осуществления частицы во множестве частиц являются многогранными, например кубическими. В определенных вариантах осуществления частицы во множестве частиц являются сферическими. В определенных вариантах осуществления любая из частиц, описываемых в настоящем документе, может являться пористой. Такие пористые частицы обладают внешней поверхностью и внутренними поверхностями пор частиц. Средство можно иммобилизовать, например, на внутренних поверхностях. В определенных вариантах осуществления размер множества пор в поперечном сечении составляет по меньшей мере 50 нм. В определенных вариантах осуществления размер множества пор в поперечном сечении составляет по меньшей мере 100 нм. Пористые наночастицы описаны, например, в публикациях патентных заявок США №№ 20140199352, 20080277346 и 20040105821, описание каждой из которых полностью включено в качестве ссылки. Сферические частицы описаны, например, в патентах США №№ 8778830 и 8586096, каждый из которых, таким образом, включен в качестве ссылки.

В определенных вариантах осуществления осуществления сферические частицы могут дополнительно содержать два пересекающиеся борозды, идущие от сферической поверхности частицы, где наибольший размер каждой из структур составляет не более 1 мкм и где борозды расположены и ориентированы: (i) для ингибирования связывания или активирования средством, иммобилизованным на поверхности сферической частицы, рецепторного белка клеточной поверхности, и/или (ii) когда растворимая биомолекула связана со средством, для ингибирования взаимодействия растворимой биомолекулы и второго участника пары со специфическим связыванием, в которой растворимая биомолекула является первым участником.

В определенных вариантах осуществления частицы в множестве частиц являются тороидальными. В таких вариантах осуществления средство может быть иммобилизовано на внутренней кольцевой поверхности частицы (например, вокруг отверстия см. фиг. 2). В определенных вариантах осуществления диаметр частицы составляет не более 600 (например, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 200 или 150) нм.

В определенных вариантах осуществления частицы, описываемые в настоящем документе, являются древовидными. Такие частицы описаны, например, в Du et al. (2015) Small 11(4):392-413; патентах США №№ 5814272 и 7932311 и публикации патентной заявки США № 20040166166, описания каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки. Как предоставлено ниже, в определенных вариантах осуществления геометрия древовидных частиц является такой, что средство, иммобилизованное на внутренней поверхности частицы, обладает сниженной или значительно сниженной способностью взаимодействовать с биомолекулой на поверхности клетки, и/или растворимая биомолекула, связанная с частицей с помощью средства, обладает сниженной или по значительно сниженной способностью взаимодействовать с распознаваемым ей лигандом (вторым участником пары со специфическим связыванием).

В определенных вариантах осуществления частицы в множестве частиц являются многогранными, например октаэдрическими или икосаэдрическими (см., например, фиг. 3), правильными или неправильными. Частицы могут содержать по меньшей мере один выступ по меньшей мере из одной из их вершин (см., например, фиг. 3). Частицы могут содержать более одного (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или более) выступа из их вершин. Такие выступы могут быть расположены и/или ориентированы, например: (i) для ингибирования связывания или активации средством, иммобилизованным на поверхности сферической частицы рецепторного белка клеточной поверхности, и/или (ii) когда растворимая биомолекула связана со средством, для ингибирования взаимодействия растворимой биомолекулы и второго участника пары со специфическим связыванием, в которой растворимая биомолекула является первым участником.

III. Частицы, содержащие поры.

В определенных вариантах осуществления пористость материала, используемого для получения частиц (например, силикона), может составлять приблизительно от 40 до приблизительно 95%, например приблизительно от 60 до приблизительно 80%. Как используют в настоящем документе, пористость представляет собой меру пустых пространств в материале и представляет собой долю объема пустот относительно общего объема материала. В определенных вариантах осуществления носитель пористости материала составляет по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере приблизительно 80 или даже по меньшей мере приблизительно 90%. В конкретных вариантах осуществления пористость превышает приблизительно 40, например превышает приблизительно 50, превышает приблизительно 60 или даже превышает приблизительно 70%.

В определенных вариантах осуществления средство распределено до глубины поры от поверхности материала по меньшей мере приблизительно 0,005, по меньшей мере 0,05, по меньшей мере приблизительно 0,1, по меньшей мере приблизительно 0,2, по меньшей мере приблизительно 0,3, по меньшей мере приблизительно 0,4, по меньшей мере приблизительно 0,5, по меньшей мере приблизительно 0,6 или по меньшей мере приблизительно 0,7 мкм. В определенных вариантах осуществления средство распределено в порах материала-носителя, по существу, равномерно.

Средство можно добавлять в частицу до глубины, которую определяют как отношение к общей длине частицы. В определенных вариантах осуществления средство распределено в частице до глубины по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 30, по меньшей мере приблизительно 40, по меньшей мере приблизительно 50 или по меньшей мере приблизительно 60%.

Для контроля высвобождения биомолекулы размер пор можно предварительно устанавливать относительно пространственных характеристик средства и биомолекулы-мишени. Как правило, размеры пор, которые являются слишком маленькими, препятствуют добавлению средства и/или связыванию биомолекулы. Например, средний диаметр пор материала можно выбирать из более крупных пор, например от 15 до 40 нм, для молекул с большой молекулярной массой, например 200000-500000 а.е.м., и менее крупных пор, например от 2 до 10 нм, для молекул с меньшей молекулярной массой, например 10000-500000 а.е.м. Например, средние размеры пор приблизительно 6 нм в диаметре могут подходить для молекул с молекулярной массой приблизительно от 14000 до 15000 а.е.м., например приблизительно 14700 а.е.м. Средние размеры пор приблизительно 10 нм в диаметре можно выбирать для молекул с молекулярной массой приблизительно от 45000 до 50000 а.е.м., например приблизительно 48000 а.е.м. Средние размеры пор приблизительно 25-30 нм в диаметре можно выбирать для молекул с молекулярной массой приблизительно 150000 нм.

Размер пор можно предварительно устанавливать так, чтобы он был адаптирован к молекулярным радиусам средства или биомолекулы. Например, средние размеры пор приблизительно от 25 до приблизительно 40 нм в диаметре могут подходить для молекул с наибольшим молекулярным радиусом приблизительно от 6 до приблизительно 8 нм. Молекулярные радиусы можно рассчитывать любым подходящим способом, например, с использованием физических размеров молекулы на основе данных рентгеноструктурной кристаллографии или с использованием гидродинамического радиуса, который представляет собой размер молекулы в растворенном состоянии. Так как расчет для растворенного состояния зависит от характеристик раствора, для которого производится расчет, для некоторых измерений предпочтительным может являться использование физических размеров молекулы на основе данных рентгеноструктурной кристаллографии. Как используют в настоящем документе, наибольший молекулярный радиус отражает половину наибольшего размера терапевтического средства.

В определенных вариантах осуществления средний диаметр пор выбран так, чтобы ограничивать агрегацию молекул, например белков, в поре. Предотвращение агрегации биомолекул, таких как белки, в материале-носителе может являться предпочтительным, так как полагают, что это препятствует контролируемому высвобождению молекул в биологическую систему. Таким образом, пора, которая, например, ввиду соответствия ее размера и размера биомолекулы позволяет вхождение в пору в один момент времени только одной биомолекулы, является предпочтительной порой, которая позволяет вхождение в пору и агрегацию внутри поры сразу нескольких биомолекул. В определенных вариантах осуществления в пору могут входить несколько биомолекул, но из-за глубины поры белки, распределенные по всей глубине поры, агрегируют в меньшей степени.

IV. Средство.

В определенных вариантах осуществления геометрия частицы является такой, что иммобилизованное средство обладает сниженной или значительно сниженной способностью к взаимодействию с биомолекулой на поверхности клетки. Например, в определенных вариантах осуществления TNF α или IL-2, иммобилизованные на поверхности частицы, описываемой в настоящем документе, обладают менее 50 (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1)% способности свободного TNF α или IL-2 к связыванию с рецептором TNF α или рецептором IL-2 на поверхности клетки. В определенных вариантах осуществления растворимая биомолекула, связанная с частицей, обладает сниженной или значительно сниженной способностью к взаимодействию с распознаваемым ей лигандом (вторым участником пары со специфическим связыванием). Например, растворимый TNFR, связанный с частицей, описываемой в настоящем документе, обладает менее 50 (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1)% способности свободного растворимого TNFR к взаимодействию со свободным TNF α . В другом примере растворимый вирион, связанный с частицей, описываемой в настоящем документе, обладает менее 50 (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1)% способности свободного вириона к взаимодействию с распознаваемым им рецептором(ами) клеточной поверхности и инфицированию клетки. Иллюстративные геометрические параметры частиц, способных снижать или значительно снижать взаимодействие средства с биомолекулой на клеточной поверхности или взаимодействие между биомолекулой, связанной с частицей, и распознаваемым ей лигандом, приведены на фиг. 1-3 и описаны в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления средство, иммобилизованное на поверхности частицы, представляет собой низкомолекулярное соединение, макроциклическое соединение, полипептид, пептидомиметическое соединение, аптамер, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты. Как используют в настоящем документе, "низкомолекулярное соединение" предназначено для обозначения средства с молекулярной массой меньшей приблизительно 6 кДа, а наиболее предпочтительно меньшей

приблизительно 2,5 кДа. Во многих фармацевтических компаниях имеются обширные библиотеки химических и/или биологических смесей, содержащих множества низкомолекулярных соединений, часто грибковые, бактериальные или водорослевые экстракты, которые можно подвергать скринингу с использованием любого из анализов заявки. В частности, настоящая заявка предусматривает использование малых химических библиотек, пептидных библиотек или коллекций природных продуктов. В Tan et al. описана библиотека более чем с двумя миллионами синтетических соединений, которая совместима с миниатюризированными клеточными анализами (J. Am. Chem. Soc. (1998) 120:8565-8566).

Пептидомиметики могут представлять собой соединения, в которых по меньшей мере часть исходного полипептида модифицирована и трехмерная структура пептидомиметика, по существу, остается такой же, как у исходного полипептида. Пептидомиметики могут представлять собой аналоги исходного полипептида по описанию, которые сами могут представлять собой полипептиды, содержащие одну или несколько замен или других модификаций в исходной полипептидной последовательности. Альтернативно, по меньшей мере часть последовательности исходного полипептида можно замещать непептидной структурой так, что трехмерная структура исходного полипептида, по существу, сохраняется. Другими словами, один, два или три аминокислотных остатка в последовательности исходного полипептида можно замещать непептидной структурой. Кроме того, непептидной структурой можно, но не обязательно, заменять другие части исходного полипептида. Пептидомиметики (пептидные и непептидные аналоги) могут обладать улучшенными свойствами (например, сниженным протеолизом, увеличенной задержкой или увеличенной биодоступностью). Как правило, пептидомиметики обладают улучшенной пероральной доступностью, что делает их особенно подходящими для лечения людей или животных. Следует отметить, что пептидомиметики могут обладать или не обладать сходной двухмерной химической структурой, но обладают сходными трехмерными структурными свойствами и геометрией. Каждый пептидомиметик может дополнительно содержать один или несколько уникальных дополнительных связывающих элементов.

Аптамеры представляют собой короткие олигонуклеотидные последовательности, которые можно использовать для распознавания и специфического связывания почти любой молекулы, включая белки клеточной поверхности. Эффективным является способ систематической эволюции лигандов при экспоненциальном обогащении (SELEX), и для быстрой идентификации таких аптамеров можно использовать его. Аптамеры можно получать для широкого спектра белков, важных для терапии и диагностики, таких как факторы роста и клеточные поверхностные антигены. Эти олигонуклеотиды связывают свои мишени со сходными с антителами аффинностями и специфичностями (см., например, Ulrich (2006) *Handb. Exp. Pharmacol.* 173:305-326).

Как указано выше, термин "антитело" относится к целым антителам, включая антитела различных изотипов, такие как антитела IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин "антитело" включает поликлональное антитело, моноклональное антитело и химеризованное или химерное антитело, гуманизированное антитело, приматизированное антитело, деиммунизированное антитело и полностью принадлежащее человеку антитело. Антитело можно получать или выделять у любого из множества видов, например, млекопитающих, таких как люди, не являющиеся человеком приматы (например, орангутан, бабун или шимпанзе), лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, песчанки, хомяки, крысы и мыши. Антитело может быть очищенным или рекомбинантным антителом.

Термин "фрагмент антитела", "связывающий биомолекулу фрагмент" или подобные термины относятся к фрагменту антитела, который сохраняет способность к связыванию с антигеном-мишенью. Такие фрагменты включают, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), фрагмент Fd, фрагмент Fab, фрагмент Fab' или фрагмент F(ab')₂. Фрагмент scFv представляет собой одну полипептидную цепь, которая содержит переменные области тяжелых и легких цепей антитела, из которого получен scFv. Кроме того, в определение антитела также включены и подходят для применения в способах, описываемых в настоящем документе, интраантитела, миниантитела, триотела и диатела (см., например, Todorovska et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248 (1):47-66; Hudson and Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231(1):177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; Rondon and Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51:257-283, описание каждого из которых полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки). Также термин "антитело" включает биспецифические антитела (включая антитела DVD-Ig).

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные, предпочтительно принадлежащие человеку или гуманизированные антитела со специфичностью связывания по меньшей мере к двум различным антигенам.

Как используют в настоящем документе, термин "антитело" также включает, например, однодоменные антитела, такие как камелизированные однодоменные антитела; см., например, Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235; Nuttall et al. (2000) *Curr. Pharm. Biotech.* 1:253-263; Reichmann et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231:25-38; публикации заявок PCT №№ WO 94/04678 и WO 94/25591 и патенты США №№ 6005079, 6015695 и 7794981, которые все полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к однодоменным антителам, содержащим два домена VH с модификациями так, что формируются однодоменные антитела.

В определенных вариантах осуществления средство представляет собой не являющийся антителом каркасный белок. Как правило, эти белки получают посредством адаптации на основе комбинаторной химии преобладающих лиганд- или антигенсвязывающих белков. Например, с использованием комбинаторной химии в трансферрине человека можно модифицировать участок связывания рецептора трансферрина человека с получением библиотеки различных вариантов трансферрина, некоторые из которых обладают приобретенной аффинностью к различным антигенам (см. Ali et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:24066-24073). Часть трансферрина человека, не участвующая в связывании рецептора, остается неизменной и служит в качестве каркаса, подобно каркасным областям антител, презентуя варианты участков связывания. Затем библиотеки подвергают скринингу подобно библиотеке антител в отношении представляющего интерес антигена-мишени с идентификацией тех вариантов, которые обладают оптимальными селективностью и аффинностью к антигену-мишени. Не являющиеся антителами каркасные белки, которые являются сходными по функции с антителами, предлагают, как обладающие рядом преимуществ по сравнению с антителами, которые, в частности, включают увеличенную растворимость и проникновение в ткани, менее дорогое производство и простоту конъюгации с другими представляющими интерес молекулами (см. Hey et al. (2005) *TRENDS Biotechnol.* 23 (10):514-522).

Специалисту в данной области понятно, что каркасная часть не являющегося антителом каркасного белка может включать, например, весь или часть Z-домена белка A S. aureus, трансферрина человека, десятого домена типа III фибронектина человека, домена Куница ингибитора трипсина человека, CTLA-4 человека, белка с анкириновым повтором, липокалина человек, кристаллина человек, убиквитина человек или ингибитора трипсина E. elaterium (см. Hey et al. (2005) *TRENDS Biotechnol.* 23(10):514-522).

В определенных вариантах осуществления средство представляет собой природный лиганд биомолекулы-мишени. Например, средство может представлять собой цитокин. Как используют в настоящем документе, термин "цитокин" относится к любому секретуемому полипептиду, который влияет на функции клеток и представляет собой молекулу, модулирующую взаимодействия между клетками в иммунном, воспалительном или гемопоезическом ответе. Цитокины в качестве неограничивающих примеров включают монокины и лимфокины независимо от того, какие клетки их продуцируют. Например, как правило, монокин называют таким образом ввиду продукции и секреции мононуклеарными клетками, такими как макрофаги и/или моноциты. Однако монокины также могут продуцировать многие другие клетки, такие как клетки естественных киллеров, фибробласты, базофилы, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, астроциты головного мозга, стромальные клетки костного мозга, эпидермальные кератиноциты и В-лимфоциты. Как правило, лимфокины называют таким образом ввиду продукции лимфоцитами. Примеры цитокинов в качестве неограничивающих примеров включают интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) и фактор некроза опухоли бета (TNF- β).

В определенных вариантах осуществления средство представляет собой лиганд семейства фактора некроза опухоли (TNF), например лиганд семейства TNF выбран из TNF α , TNF β , Fas-лиганда, лимфотоксина, лимфотоксина альфа, лимфотоксина бета, лиганда 4-1BB, лиганда CD30, EDA-A1, LIGHT, TLA1, TWEAK, TNF β и TRAIL.

В определенных вариантах осуществления средство представляет собой вариант природного лиганда биомолекулы-мишени, например вариант полипептида интерлейкина, такой как вариант IL-2 или вариант TNF α . Варианты по определенным вариантам осуществления изобретения могут содержать одну или несколько замен, делеций или вставок аминокислот. Замены могут являться консервативными или неконсервативными. Как используют в настоящем документе, термин "консервативная замена" относится к замене аминокислоты, находящейся в природной последовательности данного полипептида, на природную или неприродную аминокислоту с сходными стерическими свойствами. Когда боковая цепь природной аминокислоты для замены является полярной или гидрофобной, консервативную замену следует проводить такой природной аминокислотой или неприродной аминокислотой, чтобы она тоже являлась полярной или гидрофобной, и, необязательно, обладала теми же или сходными стерическими свойствами, что и боковая цепь заменяемой аминокислоты. Как правило, консервативные замены включают замены в следующих группах: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин. Однобуквенные сокращения аминокислот являются следующими: аланин (A); аргинин (R); аспарагин (N); аспарагиновая кислота (D); цистеин (C); глицин (G); глутамин (Q); глутаминовая кислота (E); гистидин (H); изолейцин (I); лейцин (L); лизин (K); метионин (M); фенилаланин (F); пролин (P); серин (S); треонин (T); триптофан (W), тирозин (Y) и валин (V). Варианты также включают фрагменты полноразмерных природных лигандов дикого типа, а также фрагменты, содержащие одну или несколько замен, вставок или делеций аминокислот относительно полноразмерного природного лиганда дикого типа, из которого получен фрагмент.

Как используют в настоящем документе, фраза "неконсервативные замены" относится к замене аминокислоты, присутствующей в исходной последовательности, другой природной или неприродной аминокислотой с другими электрохимическими и/или стерическими свойствами. Таким образом, боковая

цепь замещающей аминокислоты может являться значительно большей (или меньшей), чем боковая цепь замещаемой природной аминокислоты, и/или может содержать функциональные группы, которые со значительно отличающимися от замещаемой аминокислоты электронными свойствами.

В определенных вариантах осуществления вариант полипептида содержит по меньшей мере 2 (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более 100) замен, делеций или вставок аминокислот относительно полноразмерного полипептида дикого типа, из которого он получен. В определенных вариантах осуществления вариант полипептида содержит не более 150 (например, не более 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2) замен, делеции или вставки аминокислот относительно полноразмерного полипептида дикого типа, из которого он получен.

В определенных вариантах осуществления вариант полипептида (например, вариант полипептида IL-2 или TNF α) сохраняет по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100)% способности полноразмерного полипептида дикого типа, из которого он получен, к связыванию биомолекулы-мишени (например, участника пары со специфическим связыванием участником которой является полноразмерный полипептид дикого типа). В определенных вариантах осуществления вариант полипептида обладает большей аффинностью к биомолекуле-мишени, чем полноразмерный полипептид дикого типа, из которого получен вариант. Например, в определенных вариантах осуществления вариант полипептида обладает в 2 (3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 или даже 1000) раз большей аффинностью к биомолекуле-мишени, чем полноразмерный полипептид дикого типа, из которого получен вариант полипептида. Способы детекции или определения уровня взаимодействия двух белков известны в данной области и описаны выше.

В определенных вариантах осуществления полноразмерный природный лиганд дикого типа модулирует активность рецептора клеточной поверхности. Таким образом, варианты природных лигандов могут обладать повышенной или сниженной относительно активности природного лиганда дикого типа способностью модулировать активность рецептора. Например, в определенных вариантах осуществления вариант полипептида обладает менее 90 (например, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или менее 5)% способности полноразмерного полипептида дикого типа, из которого получен вариант, активировать рецепторный белок клеточной поверхности. В определенных вариантах осуществления вариант полипептида не активирует рецептор, с которым он связывается.

Такие иллюстративные варианты полипептидов известны в данной области. Например, в публикации международной патентной заявки № WO 2012/085891 описаны варианты лигандов семейства TNF со сниженной способностью к тримеризации и, таким образом, со сниженной способностью активировать рецепторы семейства TNF (публикация патентной заявки США № 2014/0096274, включенная, таким образом, в качестве ссылки). Дополнительные варианты лигандов TNF сохраняют способность связываться с рецепторами семейства TNF. Подходящие способы сравнения активности вариантов и природных лигандов дикого типа известны в данной области.

В определенных вариантах осуществления растворимая биомолекула представляет собой лиганд рецептора клеточной поверхности, например цитокина или хемокина, такого как любой из известных в данной области или описываемых в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой лиганд семейства фактора некроза опухоли (TNF) или его вариант. В определенных вариантах осуществления лиганд семейства TNF представляет собой TNF α или его вариант. В определенных вариантах осуществления лиганд семейства TNF представляет собой Fas-лиганд, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TLA1, TWEAK, TNF β , TRAIL или вариант любого из указанных выше).

В определенных вариантах осуществления растворимая биомолекула представляет собой молекулу, приведенную в табл. 2.

Таблица 2

Иллюстративные растворимые биомолекулы и/или средства

<u>Первый участник пары со специфическим связыванием (растворимые биомолекула или средство)</u>	<u>Сокращение гена</u>	<u>Класс молекул</u>	<u>Ассоциированное болезненное состояния</u>	<u>Второй участник пары со специфическим связыванием</u>
Фактор некроза опухоли альфа	TNF	Цитокин	AD	sTNF-R
Растворимый рецептор интерлейкина-2	IL2RA	Ловушка	Злокачественная опухоль	sIL-2R
Растворимый рецептор фактора некроза опухоли-1	TNFRSF1A	Ловушка	Злокачественная опухоль	rTNF
Растворимый рецептор фактора некроза опухоли-2	TNFRSF1B	Ловушка	Злокачественная опухоль	rTNF
Интерлейкин-2	IL2	Цитокин	AD	sIL-2R
Интерлейкин-6	IL6	Цитокин	AD	sIL-6R
Интерлейкин-8	CXCL8	Цитокин	AD	sIL-8R
Интерлейкин-1A	IL1A	Цитокин	AD	sIL-1RA
Интерлейкин-1B	IL1B	Цитокин	Воспаление	
Хемокин с мотивом C-X-C 10	CXCL10	Хемокин	Активация иммунной системы	CXCR3
Рецептор-ловушка-3	FAS	Ловушка	Злокачественная опухоль	FAS-L
Растворимый	TNFRSF10A	Ловушка	Злокачественная	TRAIL-R ₁

рецептор смерти-4			опухоль	
Растворимый рецептор смерти-5	TNFRSF10B	Ловушка	Злокачественная опухоль	TRAIL-R2
Fas-лиганд	FASLG	Цитокин	AD	sDR3
Родственный TNF индуцирующий апоптоз лиганд	TNFSF10	Цитокин	AD	sDR4/5
Хемокиновый (мотив C-X-C) лиганд 1 (стимулирующий активность роста меланомы, Альфа)	CXCL1	Хемокин	Злокачественная опухоль	
Родственный TNF слабый индуктор апоптоза	TNFSF12	Цитокин	TBD	sDR3
Матриксная металлопептидаза 1 (интерстициальная коллагеназа)	MMP1	Протеаза	Злокачественная опухоль	
Матриксная металлопептидаза 2 (желатиназа А, желатиназа 72 кДа, коллагеназа 72 кДа типа IV)	MMP2	Протеаза	OA/Злокачественная опухоль	
Матриксная металлопептидаза 3 (стромелизин 1, прожелатиназа)	MMP3	Протеаза	Злокачественная опухоль	
Матриксная металлопептидаза 9 (желатиназа В, желатиназа 92 кДа, коллагеназа 92 кДа типа IV)	MMP9	Протеаза	OA/Злокачественная опухоль	
Матриксная металлопептидаза 10 (стромелизин 2)	MMP10	Протеаза	Злокачественная опухоль	
Матриксная металлопептидаза 12 (макрофагальная эластаза)	MMP12	Протеаза	Злокачественная опухоль	

Индоламин-2, 3- диоксигеназа	IDO1	Фермент	Злокачественная опухоль	
Интерлейкин-5	IL5	Цитокин	AD	Меполизумаб
Растворимый рецептор интерлейкина-5	IL5RA	Ловушка	Злокачественная опухоль	IL-5
Растворимый рецептор интерлейкина-6	IL6R	Ловушка	Злокачественная опухоль	IL-6
Растворимый рецептор интерлейкина-3	CXCR1	Ловушка	Злокачественная опухоль	IL-8
Растворимый рецептор интерлейкина-3	IL1R1	Ловушка	Злокачественная опухоль	IL-1A
С-реактивный белок	CRP	Белок	Маркер воспаления	
Растворимый рецептор смерти-3	TNFRSF25	Ловушка		TWEAK

"AD" относится к аутоиммунным нарушениям и/или воспалительным нарушениям.

"OA" относится к остеоартриту.

В определенных вариантах осуществления каждая частица содержит множество средств. Множество средств может содержать от 10 до приблизительно 10^9 копий средства, например приблизительно от 10^3 до приблизительно 10^7 копий средства или приблизительно от 10^4 до приблизительно 10^6 копий средства.

V. Способы получения антител.

Как указано выше, в определенных вариантах осуществления средства, иммобилизованные на поверхности частицы или частиц, представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Антитела можно получать известными в данной области способами. Например, млекопитающее, такое как мышь, хомяк или кролик, можно иммунизировать иммуногенной формой растворимой биомолекулы (например, растворимого TNFR, токсина или вирусного белка). Альтернативно, иммунизацию можно проводить с использованием нуклеиновой кислоты, с которой *in vivo* экспрессируется биомолекула (например, растворимый белок), приводящая к наблюдаемому иммунному ответу. Способы придания иммуногенности белку или пептиду включают конъюгацию с носителями или другие способы, хорошо известные в данной области. Например, пептидную часть полипептида по изобретению можно вводить в присутствии адъюванта. Прохождение иммунизации можно контролировать посредством детекции титров антител в плазме или сыворотке. Для оценки уровней антител можно использовать стандартный ELISA или другие иммунологические анализы с иммуногеном в качестве антигена.

После иммунизации, можно получать антисыворотки, реагирующие с полипептидом по изобретению, и, при желании, выделять из сывороток поликлональные антитела. Для получения моноклональных антител у иммунизированного животного можно получать продуцирующие антитела клетки (лимфоциты) и стандартными способами слияния соматических клеток сливать с иммортализованными клетками, такими как миеломные клетки, с получением гибридных клеток. Такие способы хорошо известны в данной области и включают, например, способ гибридом (исходно разработанный Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), такой как способ гибридом В-клеток человек (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72) и способ гибридом с EBV, с получением моноклональных антител человека (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. p. 77-96). Гибридные клетки можно подвергать скринингу иммунохимическим способом с получением антител, специфически реагирующих с полипептидами по изобретению, и выделять моноклональные антитела.

VI. Выведение частиц.

В определенных вариантах осуществления частица содержит средство для выведения. Средство для выведения может способствовать выведению частиц биологическим путем, например посредством выведение с мочой, разрушения, выведения гепатобилиарным путем и/или посредством фагоцитоза.

Например, частица может содержать резервуар, где резервуар содержит средство для выведения. Резервуар может представлять собой отверстие или полость в теле частицы, например полость в теле пористой силиконовой частицы.

Для частиц, содержащих поры, резервуар может представлять собой пору или резервуар может являться большим или меньшим, чем средний размер пор. Резервуар может состоять из углубления в теле частицы (например, неглубокое углубление), где ширина или диаметр углубления являются большими, чем ширина или диаметр среднего размера пор. Ширина или диаметр резервуара могут по меньшей мере приблизительно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300, 400 или даже приблизительно в 500 раз

превышать ширину или диаметр среднего размера пор. Ширина или диаметр резервуара могут приблизительно в 2-10 раз превышать ширину или диаметр среднего размера пор, например приблизительно в 2-8 раз или приблизительно в 2-6 раз. Ширина или диаметр резервуара могут приблизительно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300, 400 или даже приблизительно в 500 раз превышать ширину или диаметр среднего размера пор.

Резервуар может содержать отверстие. Отверстие может быть закрыто заглушкой или мембраной, препятствуя, таким образом, взаимодействию между средством для выведения и клетками и/или внеклеточными белками (например, антителами). Заглушка или мембрана могут содержать полимер, такой как биоразлагаемый полимер. Заглушка или мембрана могут разрушаться через предопределенный период времени (например, посредством гидролиза), таким образом экспонируя средство для выведения клеткам и/или внеклеточным белкам. Заглушка или мембрана может разрушаться под действием биологической жидкости (например, плазмы крови или внеклеточной жидкости) в течение приблизительно от 1 суток до приблизительно 5 лет, например приблизительно от 1 суток до приблизительно 3 лет или приблизительно от 1 суток до приблизительно 1 года.

Предопределенный период времени может представлять собой период времени, в течение которого частица находится в жидкости (например, водной жидкости). Предопределенный период времени может представлять собой период нахождения частицы *in vivo* (например, воздействия биологических жидкостей, pH, ферментов и/или температуры). Предопределенный период времени можно определять, по меньшей мере частично, связыванием частицы с биомолекулой. Например, частицу можно конфигурировать так, что связывание биомолекулы экспонирует средство для выведения клеткам и/или внеклеточным белкам (см., например, публикация патентной заявки РСТ № WO2014/170899, включенная, таким образом, в качестве ссылки). Предопределенный период времени может составлять приблизительно от 1 суток до приблизительно 5 лет, например приблизительно от 1 суток до приблизительно 3 лет или приблизительно от 1 суток до приблизительно 1 года.

Иллюстративные материалы, пригодные для использования в качестве заглушек или мембран, описаны в патенте США № 7918842, таким образом включенном в качестве ссылки. Как правило, эти материалы разрушаются или растворяются посредством ферментативного гидролиза или воздействия воды *in vivo* или *in vitro*, или посредством поверхностной или объемной эрозии. Иллюстративные синтетические, биоразлагаемые полимеры включают поли(амиды), такие как поли(аминокислоты) и поли(пептиды); сложные поли(эферы), так как поли(молочная кислота), поли(гликолевая кислота), сополимер молочной и гликолевой кислот и поли(капролактон); поли(ангидриды); поли(ортоэферы); поли(карбонаты и их химические производные (замены, добавления химических групп, например алкилов, алкиленов, гидроксильирование, окисление и другие модификации, как правило, проводимые специалистами в данной области), сополимеры и их смеси. Другие полимеры, которые можно использовать в заглушках или мембранах, включают простые поли(эферы), такие как поли(этиленоксид), поли(этиленгликоль) и поли(тетраметиленоксид); виниловые полимеры-поли(акрилаты) и поли(метакрилаты), такие как метил-, этил-, другой алкил-, гидроксипропилакрилат, акриловая и метакриловая кислоты и другие, такие как поли(виниловый спирт), поли(винилпирролидон) и поли(винилацетат); поли(уретаны); целлюлоза и ее производные, такие как алкил-, гидроксипропилакрилат, простые эфиры, сложные эфиры, нитроцеллюлоза и различные ацетаты целлюлозы; поли(силоксаны) и любые их химические производные (замены, добавления химических групп, например алкилов, алкиленов, гидроксильирование, окисление и другие модификации, как правило, проводимые специалистами в данной области), сополимеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления заглушку резервуара получают из одного или нескольких сшитых полимеров, таких как сшитый поливиниловый спирт.

В определенных вариантах осуществления частица содержит покрытие. В определенных вариантах осуществления покрытие содержит средство для выведения. Покрытие может маскировать средство для выведения.

Частица может содержать первую поверхность и вторую поверхность; средство может быть иммобилизовано на первой поверхности; а покрытие может покрывать по меньшей мере часть второй поверхности. Первая поверхность может представлять собой внутреннюю поверхность, например первая поверхность может быть ориентирована так, что средство будет обладать сниженной способностью связываться с молекулой на клеточной поверхности. Примеры внутренней поверхности включают внутренние стенки поры, резервуара или пробирки, внутреннюю кольцевую поверхность тороида или полость вогнутой поверхности. Другие примеры внутренней поверхности включают внешнюю поверхность частицы, где внешняя поверхность защищена от взаимодействия с клетками одним или несколькими выступами. Вторая поверхность может представлять собой внешнюю поверхность, например вторая поверхность может быть ориентирована так, что покрытие может взаимодействовать с клеткой.

Покрытие может препятствовать взаимодействиям между частицами, например покрытие может снижать стремление частиц к формированию агрегатов. Покрытие может препятствовать взаимодействиям между частицами и клетками, например, представляя биологически инертную поверхность. Покрытие может препятствовать неспецифическим взаимодействиям с внеклеточными молекулами, например не-

специфической адсорбции биомолекул. Покрытие может препятствовать специфическим взаимодействиям с клетками или внеклеточными молекулами, например покрытие может препятствовать или задерживать выведение или фагоцитоз частицы. Покрытие может делать частицу мишенью для выведения или фагоцитоза. Покрытие или другая характеристика (например, "индуцирующее выведение соединение"), которые делают частицу мишенью для выведения или фагоцитоза, могут быть замаскированы покрытием (например, вторым покрытием), которое задерживает выведение или фагоцитоз частицы, например, для обеспечения сохранения частиц в кровотоке в течение predetermined периода времени.

Например, частица может содержать второе покрытие, где второе покрытие состоит из второго множества покрывающих молекул. Частица может содержать второе множество покрывающих молекул. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул может снижать выведение частиц *in vivo*, например, маскируя покрытие и/или множество покрывающих молекул. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул могут быть биоразлагаемыми, например, экспонируя покрытие и/или множество покрывающих молекул клеткам и/или внеклеточным белкам через predetermined период времени. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул может содержать биоразлагаемый полимер, например каждая молекула второго множества покрывающих молекул может содержать биоразлагаемый полимер. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул может содержать CD47, который ингибировать фагоцитоз.

В определенных вариантах осуществления частица содержит первую поверхность (например, внутреннюю поверхность) и вторую поверхность (например, внешнюю поверхность); средство иммобилизовано на первой поверхности; а покрытие покрывает по меньшей мере часть второй поверхности. Ориентация первой поверхности может снижать способность средства взаимодействовать с молекулами на клеточной поверхности. Ориентация второй поверхности может обеспечивать взаимодействия между покрытием и клетками, внеклеточными молекулами и/или различными частицами. "Взаимодействие" между покрытием и клетками, внеклеточными молекулами и/или различными частицами может быть слабым, нейтральным или неблагоприятным взаимодействием, например, препятствуя стабильному связыванию частицы с клеткой, внеклеточной молекулой или другой частицей. Альтернативно, взаимодействие между покрытием и клетками и/или внеклеточными молекулами может быть специфическим или планируемым взаимодействием, например, для содействия выведению частицы биологическим путем, таким как фагоцитоз. В определенных предпочтительных вариантах осуществления вторая поверхность, по существу, не содержит средства. В определенных предпочтительных вариантах осуществления первая поверхность, по существу, не содержит покрытия. В определенных предпочтительных вариантах осуществления покрытие покрывает, по существу, всю вторую поверхность.

В определенных вариантах осуществления частица содержит первую поверхность (например, внутреннюю поверхность) и вторую поверхность (например, внешнюю поверхность); средство иммобилизовано на первой поверхности и второй поверхности; а покрытие покрывает по меньшей мере часть второй поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие (и/или второе покрытие) может ингибировать взаимодействия между средством и молекулами на клеточной поверхности. В определенных предпочтительных вариантах осуществления покрытие покрывает, по существу, всю вторую поверхность.

В определенных вариантах осуществления частица содержит первую поверхность (например, внутреннюю поверхность) и вторую поверхность (например, внешнюю поверхность); средство иммобилизовано на первой поверхности; а покрытие покрывает по меньшей мере часть первой поверхности и по меньшей мере часть второй поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие предпочтительно не влияет на способность средства специфически связываться с биомолекулой. В определенных предпочтительных вариантах осуществления покрытие покрывает, по существу, всю вторую поверхность.

В определенных вариантах осуществления частица содержит поверхность; средство иммобилизовано на поверхности; и покрытие покрывает по меньшей мере часть поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие может не влиять на способность средства к специфическому связыванию с биомолекулой. Покрытие может позволять определенной доле средства специфически связываться с биомолекулой и ингибировать взаимодействия между определенной долей средства и биомолекулой. Покрытие может ингибировать взаимодействия между средством и молекулами на клеточной поверхности. В определенных предпочтительных вариантах осуществления покрытие покрывает, по существу, всю поверхность.

Покрытие может содержать покрывающие молекулы, например покрытие может состоять из множества покрывающих молекул или покрытие может состоять из группы покрывающих молекул. Как используют в настоящем документе, каждый из терминов "множество покрывающих молекул" и "группа покрывающих молекул" относится к покрытию. Однако термин "покрытие" может относиться к дополнительным композициям, таким как гидрогель. Покрывающая молекула может представлять собой средство для выведения (и таким образом, средство для выведения может представлять собой покрывающую молекулу).

Частица может содержать множество покрывающих молекул. Частица может содержать поверхность и множество средств, иммобилизованных на поверхности, и по меньшей мере одна молекула из множества покрывающих молекул может быть связана с поверхностью. Например, все или по существу

все молекулы множества покрывающих молекул могут быть связаны с поверхностью.

Частица может содержать поверхность и вторую поверхность, где множество средств, иммобилизованных на поверхности, и по меньшей мере одна молекула из множества покрывающих молекул могут быть связаны со второй поверхностью. Например, все или по существу все из молекулы множества покрывающих молекул могут быть связаны со второй поверхностью. В определенных вариантах осуществления определенные молекулы из множества покрывающих молекул связаны с поверхностью и определенные молекулы из множества покрывающих молекул связаны со второй поверхностью.

В определенных вариантах осуществления покрывающие молекулы увеличивают выведение частиц *in vivo*. Например, покрывающие молекулы могут содержать ассоциированную с патогеном молекулярную структуру.

В определенных вариантах осуществления частицы, описываемые в настоящем документе, содержат покрытие, содержащее индуцирующее выведение соединение, которое способствует выведению частиц из кровотока, например, почками, печенью/кишечником (например, посредством желчи) или посредством фагоцитоза (например, антигенпрезентирующими клетками).

Множество покрывающих молекул может представлять собой множество индуцирующих выведение соединений. Например, в вариантах осуществления, в которых частицы являются тороидальными, внутренняя кольцевая поверхность (например, первая поверхность) может содержать иммобилизованное средство, а внешняя поверхность (например, вторая поверхность) может содержать соединение, которое индуцирует выведение частиц, например, почками, печенью или макрофагами. В определенных вариантах осуществления индуцирующее выведение соединения является программируемым. Т.е. соединение может быть покрыто покрытием, которое с течением времени (например, в течение predetermined периода времени) в конечном итоге разрушается (например, под действием ферментов, гидролиза или постепенного растворения), экспонируя индуцирующее выведение соединения или другое свойство, которое увеличивает скорость выведения. Покрытие может разрушаться под действием биологической жидкости (например, плазмы крови или внеклеточной жидкости) в течение приблизительно от 1 суток до приблизительно 5 лет, например приблизительно от 1 суток до приблизительно 3 лет или приблизительно от 1 суток до приблизительно 1 года. Таким образом, присутствие частиц *in vivo* можно модифицировать и/или контролировать.

Покрытие может содержать органический полимер, такой как полиэтиленгликоль (PEG). Органический полимер может быть связан с частицей, например связан с поверхностью частицы. Органический полимер может включать PEG, полилактат, полимолочные кислоты, сахара, липиды, полиглутаминовую кислоту, полигликолевую кислоту (PGA), полимолочную кислоту (PLA), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA), поливинилацетат (PVA) и их сочетания. В определенных вариантах осуществления частица ковалентно конъюгирована с PEG, который препятствует адсорбции сывороточных белков, способствует эффективному выведению с мочой и снижает агрегацию частиц (см., например, Burns et al. *Nano Letters*, 9(1):442-448 (2009) и публикации патентных заявок США №№ 2013/0039848 и 2014/0248210, каждая из которых, таким образом, включена в качестве ссылки).

В одном из вариантов осуществления покрытие содержит по меньшей мере одну гидрофильную молекулу, например полимеры типа плороников® (неионные полиоксиэтиленполиоксипропиленовые блок-сополимеры с общей формулой $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(-\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$), триблок-сополимеры поли(этиленгликоль-*b*-(DL-молочная кислота-*co*-гликолевая кислота)-*b*-этиленгликоль) (PEG-PLGA-PEG), диблок-сополимер поликапролактон-PEG (PCL-PEG), поли(винилиденфторид)-PEG (PVDF-PEG), поли(молочная кислота-*co*-PEG) (PLA-PEG), поли(метилметакрилат)-PEG (PMMA-PEG) и т.д. В одном из вариантов осуществления с такой молекулой гидрофильная молекула представляет собой молекулу PEG, такую как

[метокси(полиэтиленокси)пропил]триметоксисилан (например, $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6,9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)_3$),
 [метокси(полиэтиленокси)пропил]диметоксисилан (например, $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6,9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2$) или
 [метокси(полиэтиленокси)пропил]монометоксисилан (например, $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6,9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)$).

Подходящие покрытия описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2011/0028662 (включенной, таким образом, в качестве ссылки).

Покрытие может включать полигидроксильированный полимер, такой как природные полимеры или гидроксилсодержащие полимеры, включающие многократно гидроксильированные полимеры, полисахариды, углеводы, полиолы, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, такие как полисерин или другие полимеры, такие как 2-(гидроксиэтил)метакрилат, или их сочетания. В определенных вариантах осуществления полигидроксильированные полимеры представляют собой полисахариды. Полисахариды включают маннан, пуллулан, мальтодекстрин, различные виды крахмала, целлюлозу и производные целлюлозы, камеди, ксантановую камедь, камедь плодов рожкового дерева или пектин, их сочетания (см., например, публикацию патентной заявки США № 2013/0337070, включенную, таким образом, в качестве ссылки).

В определенных вариантах осуществления покрытие содержит цвиттер-ионный полимер (см., например, публикации патентных заявок США №№ 2014/0235803, 2014/0147387, 2013/0196450 и 2012/0141797 и патент США № 8574549, каждый из которых, таким образом, включен в качестве ссылки).

ки).

Другие подходящие покрытия включают поли-альфа-гидроксикислоты (включая полимолочную кислоту или полилактид, полигликолевую кислоту или полигликолид), поли-бета-гидроксикислоты (такие как полигидроксибутират или полигидроксиалерат), эпокси-полимеры (включая полиэтиленоксид (PEO)), поливиниловые спирты, сложные полиэфиры, полиортоэфиры, сложные полиамидоэфиры, сложные полиэфирамиды, полифосфоэфиры и полифосфоэфируретаны. Примеры разрушаемых сложных полиэфиров включают поли(гидроксиалканоаты), включая поли(молочную кислоту) или (полилактид, PLA), поли(гликолевую кислоту) или полигликолид (PGA), поли(3-гидроксибутират), поли(4-гидроксибутират), поли(3-гидроксиалерат) и поли(капролактон) или поли(валеролактон). Примеры сложных полиоксифиров включают поли(алкиленоксалаты), такие как поли(этиленоксалат) и сложные полиоксифиры, содержащие группы амидо. Другие подходящие материалы покрытий включают простые полиэфиры, включая полигликоли, сополимеры простых эфиров и сложных эфиров (сополи(простой эфир-сложный эфир)) и поликарбонаты. Примеры биоразлагаемых поликарбонатов включают полиортокарбонаты, полииминокарбонаты, полиалкилкарбонаты, такие как поли(триметиленкарбонат), поли(1,3-диоксан-2-он), поли(р-диоксанон), поли(6,6-диметил-1,4-диоксан-2-он), поли(1,4-диоксепан-2-он) и поли(1,5-диоксепан-2-он). Также подходящие биоразлагаемые покрытия могут включать полиангидриды, полиимины (такие как поли(этиленимин) (PEI)), полиамиды (включая поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид), поли(аминокислоты) (включая полилизин, такой как поли-L-лизин, или полиглутаминовую кислоту, такую как поли-L-глутаминовая кислота), полифосфазены (такие как поли(фенокси-со-карбоксилатофеноксифосфазен), полиорганофосфазены, полицианоакрилаты и полиалкилцианоакрилаты (включая полибутилцианоакрилат), полиизоцианаты и поливинилпирролидоны.

Длина цепи полимерной покрывающей молекулы может составлять приблизительно от 1 до приблизительно 100 мономерных единиц, например приблизительно от 4 до приблизительно 25 единиц.

Частицу можно покрывать природным полимером, включая фибрин, фибриноген, эластин, казеин, коллагены, хитозан, внеклеточный матрикс (ECM), каррагенан, хондроитин, пектин, альгинат, альгиновую кислоту, альбумин, декстрин, декстраны, желатин, маннит, н-галамин, полисахариды, поли-1,4-глюканы, крахмал, гидроксиэтилкрахмал (HES), диальдегидкрахмал, гликоген, амилазу, гидроксиэтиламилазу, амилопектин, глюкозогликаны, жирные кислоты (и их сложные эфиры), гиалуроновую кислоту, протамин, полиаспарагиновую кислоту, полиглутаминовую кислоту, D-маннуриновую кислоту, L-гулуриновую кислоту, зеин и другие проламины, альгиновую кислоту, гуаровую камедь и фосфорилхолин, а также их сополимеры и производные. Покрытие также может содержать модифицированный полисахарид, такой как целлюлоза, хитин, декстран, крахмал, гидроксиэтилкрахмал, полиглюконат, гиалуроновая кислота и желатин, а также их сополимеры и производные.

Частицу можно покрывать гидрогелем. Гидрогель можно формировать, например, с использованием основного полимера, выбранного из любых подходящих полимеров, таких как поли(гидроксиалкил(мет)акрилаты), сложные полиэфиры, поли(мет)акриламиды, поли(винилпирролидон) или поливинилловый спирт. Сшивающим средством может являться один или несколько из пероксидов, серы, дихлорида серы, оксидов металлов, селена, теллурия, диаминов, диизоцианатов, алкилфенилдисульфидов, тетраалкилтиурамдисульфидов, 4,4'-дитиоморфолина, п-хининдиоксида и тетрахлор-п-бензохинона. Также в гидрогели можно вводить содержащие бороновую кислоту полимеры с необязательными фотополимеризуемыми группами.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления покрытие содержит материал, который одобрен для применения U.S. Food and Drug Administration (FDA). Эти одобренные FDA материалы включают полигликолевую кислоту (PGA), полимолочную кислоту (PLA), полигалактин 910 (содержащий гликолидные и лактидные единицы в отношении 9:1, и также известный как викрил (VICRYL™)), полиглюконат (содержащий гликолидные и триметиленкарбонатные единицы в отношении 9:1, и также известный как максон (MAXON™)) и полидиоксанон (PDS).

Связывание покрытия с частицей можно проводить посредством ковалентной связи или нековалентной связи, такой как ионная связь, водородная связь, гидрофобная связь, координирование, адгезия или физические абсорбция или взаимодействие.

Общепринятые способы покрытия наночастиц включают способы сухого и влажного покрытия. Способы сухого покрытия включают: (a) физическое осаждение из газовой фазы (Zhang, Y. et al. *Solid State Commun.* 115:51 (2000)), (b) обработку плазмой (Shi, D. et al. *Appl. Phys. Lett.* 78:1243 (2001); Volath, D. et al. *J. Nanoparticle Res.* 1:235 (1999)), (c) химическое осаждение из газовой фазы (Takeo, O. et al. *J. Mater. Chem.* 8:1323 (1998)) и (d) пиролиз полимерных или неполимерных органических материалов для осаждения наночастиц *in situ* в матриксе (Sglavo, V.M. et al. *J. Mater. Sci.* 28:6437 (1993)). Способы влажного покрытия частиц включают: (a) способы золь-гель и (b) способы эмульгирования и выпаривания растворителя (Cohen, H. et al. *Gene Ther.* 7:1896 (2000); Hrkach, J.S. et al. *Biomaterials* 18:27 (1997); Wang, D. et al. *J. Control. Rel.* 57:9 (1999)). Покрытие можно наносить посредством электроосаждения, покрытие распылением, покрытие погружением, напыления, химического осаждения из газовой фазы или физического осаждения из газовой фазы. Кроме того, способы покрытия различных наночастиц по-

лисахаридами известны в данной области (см., например, патент США № 8685538 и публикацию патентной заявки США № 2013/0323182, каждый из которых, таким образом, включен в качестве ссылки).

В определенных вариантах осуществления частицы можно адаптировать для содействия выведению посредством экскреции с мочой. Выведение почками у индивидуумов с нормальной функцией почек, как правило, требует частиц по меньшей мере с одним размером, меньшим 15 нм (см., например, Choi, H.S., et al. *Nat. Biotechnol.* 25(1):1165 (2007); Longmire, M. et al., *Nanomedicine* 3(5):703 (2008)). Однако с мочой могут выводиться более крупные частицы. В вариантах осуществления, в которых частица является слишком большой для выведения почками, частицу, однако, можно вывести после разрушения *in vivo* до меньшего размера.

В определенных вариантах осуществления частицы можно адаптировать для содействия выведению посредством гепатобилиарного выведения. В захвате в печени и последующем выведении наночастиц с желчью участвует система мононуклеарных фагоцитов (MPS), которая включает клетки Купфера в печени. Известно, что определенный размер и свойства поверхности наночастиц увеличивают захват MPS в печени (см. Choi et al., *J. of Dispersion Sci. Tech.* 24(3/4):475-487 (2003) и Brannon-Peppas et al., *J. Drug Delivery Sci. Tech.* 14(4):257-264 (2004), каждая из которых включена в качестве ссылки). Например, известно, что повышенная гидрофобность частицы увеличивает захват MPS. Таким образом, для модуляции выведения с желчью специалист в данной области может выбирать частицы с определенными характеристиками. Гепатобилиарная система позволяет выводить частицы, размер которых немного превосходит размер частиц, которые может выводить почечная система (например, от 10 до 20 нм). Для вариантов осуществления, в которых частицы являются слишком большими для выведения посредством гепатобилиарной системы, частицы, тем не менее, можно выводить после разрушения *in vivo* до меньшего размера. В таких вариантах осуществления покрытие, которое способствует выведению посредством гепатобилиарной системы, может покрывать часть внутренней поверхности частицы так, что экспонирование покрытия происходит после разрушения частицы. Частица может содержать множество покрывающих молекул, например гидрофобных молекул, которые покрывают часть поверхности. Экспонирование поверхности может происходить после разрушения частицы, обеспечивая выведение разрушенной частицы.

В определенных вариантах осуществления частица адаптирована для содействия выведению посредством фагоцитоза. Например, частица может содержать средство для выведения, где средство для выведения содержит ассоциированную с патогеном молекулярную структуру, например, для распознавания макрофагами.

Ассоциированные с патогеном молекулярные структуры (PAMP) включают ДНК с неметилованными CpG (бактериальную), двухцепочечную РНК (вирусную), липополисахарид (бактериальный), пептидогликан (бактериальный), липоарабиноманнан (бактериальный), зимозан (дрожжевой), микоплазменные липопротеины, такие как MALP-2 (бактериальный), флагеллин (бактериальный), поли(инозиновую-цитидиловую) кислоту (бактериальную), липотейхоевую кислоту (бактериальную) и имидазохинолины (синтетические). В предпочтительных вариантах осуществления средство PAMP для выведения замаскировано так, что макрофаги не поглощают частицу до связывания частицы с одной или несколькими мишенями. Например, средство PAMP для выведения может быть замаскировано любым из указанных выше покрытий (например, полимерным покрытием, таким как биоразлагаемое полимерное покрытие). Макрофаги могут поглощать частицы до 20 мкм (см., например, Cannon, G.J. and Swanson, J.A., *J. Cell Science* 101:907-913 (1992); Champion, J.A., et al. *Pharm Res* 25(8):1815-1821 (2008)). В определенных вариантах осуществления средство для выведения, способствующее выведению посредством фагоцитоза, может покрывать часть внутренней поверхности частицы так, что после разрушения частицы происходит экспозиция средства для выведения. Частица может содержать множество средств для выведения, например PAMP, которые покрывают часть поверхности. Экспозиция поверхность может происходить после разрушения частицы, обеспечивая выведение разрушенной частицы. Средство для выведения может покрывать часть поверхности, которая перекрывает поверхность, содержащую средство. Средство для выведения (например, PAMP) может вызывать иммунный ответ против частицы, например, после разрушения второго покрытия или после разрушения частицы.

В определенных вариантах осуществления иммунный ответ, направленный против средства для выведения (например, PAMP), может превосходить иммунный ответ, направленный против средства и/или комплекса средства/биомолекулы, таким образом, ингибируя или задерживая начало иммунного ответа, направленного против средства и/или комплекс средства/биомолекулы. Например, разрушение частицы может экспонировать средство для выведения и средство (и/или комплекс средства/биомолекулы) лейкоцитам. Средство PAMP для выведения может обеспечивать быстрое выведение разрушенных частиц макрофагами, таким образом, задерживая иммунный ответ (например, опосредуемый В-клетками иммунный ответ) против средства и/или комплекса средства/биомолекулы.

Средство для выведения может представлять собой кальретикулин, индуцирующий фагоцитоз.

В определенных вариантах осуществления организм может выводить частицы в течение периода приблизительно от 1 суток до приблизительно 5 лет, например приблизительно от 1 суток до приблизительно 3 лет или приблизительно от 1 суток до приблизительно 1 года.

VII. Способы введения.

Описание предусматривает, что композиции, описываемые в настоящем документе (например, любые из описанных в общем или конкретно частиц или множества частиц, описываемых в настоящем документе), можно вводить в клетки и ткани *in vitro* и/или *in vivo*. Введение *in vivo* включает введение животному в модели заболевания на животных, например модели злокачественной опухоли на животных, или введение нуждающемуся в этом индивидууму. Подходящие клетки, ткани или индивидуумы включают животных, таких как домашние животные, домашний скот, животные в зоопарках, вымирающие виды, редкие животные, не являющиеся человеком приматы и люди. Иллюстративные домашние животные включают собак и кошек.

Для доставки *in vitro*, например, в клетки или ткани в культуре и/или в их окружение композиции можно добавлять в среды для культивирования, например для контакта с микроокружением или контакта с растворимым материалом в средах для культивирования или контакта с клетками или даже проникновения в клетки. На механизм доставки и средства введения композиции (например, частиц, описываемых в настоящем документе) влияет желаемый участок активности.

Для доставки *in vivo*, например, в клетки или ткани *in vivo* (включая микроокружение клеток и ткань) и/или нуждающемуся в этом индивидууму предусмотрено множество способов введения. Конкретный способ можно выбрать с учетом композиции частиц и конкретного применения и пациента. Для введения средств по изобретению известны и можно использовать различные системы доставки. Любой из таких способов можно использовать для доставки любого из средств, описываемых в настоящем документе. Способы введения могут являться энтеральными или парентеральными, включая в качестве неограничивающих примеров интрадермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, интрамиокардиальный, внутривенный, подкожный, легочный, интраназальный, интраокулярный, эпидуральный и пероральный маршруты. Композицию по изобретению можно вводить любым удобным маршрутом, например посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальные или слизистые выстилки (например, пероральная слизистая, ректальная слизистая и слизистая кишечника и т.д.) и можно вводить вместе (одновременно или последовательно) с другими биологически-активными средствами. Введение может быть системным или местным.

В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно, например посредством болюсной инъекции или инфузии. В определенных вариантах осуществления композицию вводят перорально, подкожно, внутримышечно или интраперитонеально.

В определенных вариантах осуществления желательным может являться местное введение композиции по изобретению в область, нуждающуюся в лечении (например, в участок опухоли, например, посредством инъекции в опухоль).

Частым участком метастазирования является печень. Таким образом, в определенных вариантах осуществления доставка композиции, описанной в настоящем документе, направлена в печень. Например, для доставки средства по изобретению в печень в воротную вену печени можно помещать венозный катетер. Также предусмотрены другие способы доставки через воротную вену печени.

В определенных вариантах осуществления композиции по изобретению вводят посредством внутривенной инфузии. В определенных вариантах осуществления инфузию композиции проводят в течение периода по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 мин. В других вариантах осуществления инфузию средства проводят в течение периода по меньшей мере 60, 90 или 120 мин. Вне зависимости от периода инфузии по изобретению предусмотрено, что в определенных вариантах осуществления каждая инфузия является частью общего плана лечения, когда средство вводят в соответствии со стандартным графиком (например, еженедельно, ежемесячно и т.д.) в течение определенного периода времени. Однако в других вариантах осуществления композицию доставляют посредством болюсной инъекции, например, как часть общего плана лечения, когда средство вводят в соответствии со стандартным графиком в течение определенного периода времени.

Для любого из указанного выше, предусмотрено, что композиции по изобретению (включая одно средство или комбинацию двух или более таких средств) можно вводить *in vitro* или *in vivo* любым подходящим маршрутом или способом. Композиции можно вводить как часть схемы лечения, когда композицию вводят один раз или несколько раз, включая введение по конкретной схеме. Кроме того, предусмотрено, что композиции по изобретению при необходимости формулируют для конкретных маршрута введения и применения. По изобретению предусмотрено, что любую комбинацию указанных выше признаков, а также комбинации с любым из аспектов и вариантов осуществления изобретения, описываемых в настоящем документе.

Указанное выше применимо к любым композициям (например, частице или множеству частиц) по изобретению, используемым отдельно или в комбинации, и используемым в любом из способов, описываемых в настоящем документе. По изобретению конкретно предусмотрена любая комбинация признаков таких композиций по изобретению, композиции и способы с признаками, описанными для различных фармацевтических композиций и маршрутов введения, описанных в этом разделе и ниже.

VIII. Фармацевтические композиции.

В определенных вариантах осуществления описываемые частицу или частицы по настоящему изобретению формулируют с фармацевтически приемлемым носителем. Одну или несколько композиций

(например, содержащих частицу или множество частиц, описываемых в настоящем документе) можно вводить отдельно или как компонент фармацевтического состава (композиций). Любую из композиций по изобретению, в общем или конкретно описываемых в настоящем документе, можно формулировать, как описано в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления композиция содержит две или более частиц по изобретению или частицу по изобретению, сформулированную со вторым терапевтическим средством.

Композицию по изобретению можно формулировать для введения любым удобным способом для применения у человека или в ветеринарии. Также в композициях могут присутствовать средства для смачивания, эмульгаторы и смазочные средства, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, средства контроля высвобождения, покрывающие средства, подсластители, вкусоароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Составы описываемых частицы или частиц включают, например, составы, подходящие для перорального, назального, местного, парентерального, ректального и/или интравагинального введения. Составы в целях удобства можно предоставлять в стандартной лекарственной форме и можно получать любым из способов, хорошо известных в области фармацевции. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единой лекарственной формы, варьирует в зависимости от подлежащего лечению индивидуума и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единой лекарственной формы, как правило, составляет количество соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект.

В определенных вариантах осуществления способы получения этих составов или композиций включают комбинирование одной или нескольких частиц и носителя и, необязательно, одного или нескольких дополнительных ингредиентов. Как правило, составы можно получать в жидком носителе или высокодисперсном твердом носителе или в обоих, а затем, если необходимо, придавать продукту форму.

Составы для перорального введения могут находиться в форме капсул, облаток, пилюль, таблеток, таблеток-леденцов (с использованием ароматизированной основы, как правило, сахарозы и гуммиарабика или трагаканта), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертного основания, такого как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик), и/или в виде промываний для рта и т.п., где каждый содержит predetermined количество частиц по изобретению. В дополнение к активным соединениям суспензии могут содержать суспендирующие средства, такие как этоксилированные изостеариловые спирт, полиоксиэтиленсорбит и сложные сорбитановые эфиры, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

В твердых лекарственных формах для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т.п.) одну или несколько композиций по настоящему изобретению можно смешивать с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дифосфат кальция, и/или с любым из следующих: (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие средства, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) дезинтегрирующие средства, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющие растворение средства, такие как парафин; (6) ускорители всасывания, такие как четвертичные аммонийные соединения; (7) средства для смачивания, такие как, например, цетиловый спирт и глицеринмоностеарат; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазочные средства, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красители. В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции также могут содержать буферные средства. Твердые композиции подобного типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п. Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широкоиспользуемые в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбита и их смеси. Кроме инертных разбавителей пероральные композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как средства для смачивания, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, вкусо-ароматические добавки, красители, отдушки и консерванты.

В определенных вариантах осуществления способы по изобретению включают местное применение

на кожу или слизистые оболочки, такие как оболочки шейки матки и влагалища. Местные составы могут дополнительно содержать один или несколько из широкого спектра средств, известных как эффективные в качестве усилителей впитывания в кожу или роговой слой. Их примеры представляют собой 2-пирролидон, N-метил-2-пирролидон, диметилацетамид, диметилформамид, пропиленгликоль, метиловый или изопропиловый спирт, диметилсульфоксид и азон. Кроме того, для получения косметически приемлемого состава можно включать дополнительные средства. Их примеры представляют собой жиры, воска, масла, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы и поверхностно-активные средства. Также можно включать кератолитические средства, такие как кератолитические средства, известные в данной области. Их примеры представляют собой салициловую кислоту и серу. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Описываемые средства по изобретению можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться. Мази, пасты, кремы и гели кроме описываемого средства по изобретению могут содержать такие эксципиенты, как животные и растительные жиры, масла, воска, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, кремнийорганические соединения, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или их смеси. Порошки и спреи, кроме описываемого средства по изобретению, могут содержать такие эксципиенты, как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси этих веществ. Спреи дополнительно могут содержать стандартные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать одну или несколько композиций по изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильные порошки, которые непосредственно перед применением можно восстанавливать в стерильные инъекционные растворы или дисперсии, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики, растворимые компоненты, которые обеспечивают изотоничность состава крови получившего назначение реципиента, или суспендирующие средства или загустители. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, используя такие материалы покрытия, как лецитин, поддерживая требуемый размер частиц в случае дисперсий и используя поверхностно-активные вещества.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, средства для смачивания, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также желательным может являться включение в композиции средств придания изотоничности, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно обеспечивать пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы посредством включения средств, задерживающих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Формы инъекционных депо получают, формируя микроинкапсулированные матриксы одной или нескольких частиц в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от отношения лекарственного средства к полимеру и характера конкретного применяемого полимера можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Составы инъекционных депо также получают, включая лекарственное средство в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению стандартными способами формулируют в виде фармацевтических композиций, адаптированных для внутривенного введения человеку или животным, таким как домашние животные. Когда необходимо, композиция также может включать солибулизатор и местный анестетик, такой как лидокаин, для снижения боли в участке инъекции. Когда композицию необходимо вводить посредством инфузии, ее можно помещать во флакон для инфузий, содержащий стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Когда композицию вводят посредством инъекции, можно предоставлять ампулу со стерильной водой или солевым раствором для инъекций так, чтобы ингредиенты до введения можно было смешивать.

В другом варианте осуществления композиции (например, частица или частицы), описываемые в настоящем документе, формулируют для подкожного, интраперитонеального или внутримышечного введения человеку или животным, таким как домашние животные.

В определенных вариантах осуществления средства и частицы по настоящему изобретению формулируют для местной доставки в опухоль, например для доставки для внутриопухолевой инъекции.

В определенных вариантах осуществления композиция предназначена для местного введения в печень посредством воротной вены печени, и средства и частицы можно формулировать соответственно.

В определенных вариантах осуществления конкретный состав пригоден для использования в случае доставки более чем одним маршрутом. Таким образом, например, состав, подходящий для внутривенной инфузии, также может подходить для доставки через воротную вену печени. Однако в других вариантах осуществления состав пригоден для использования в случае одного маршрута доставки, но не пригоден в случае второго маршрута доставки.

Количество средства или частицы по изобретению, которое эффективно при лечении такого патологического состояния, как злокачественная опухоль, и/или эффективно для нейтрализации растворимого TNFR, и/или эффективно для снижения количества TNF альфа или его активности связывания растворимым TNFR, в частности растворимым TNFR, присутствующим в микроокружении опухоли и, необязательно, в плазме, и/или эффективно при ингибировании пролиферации, роста или выживания клеток опухоли *in vitro* или *in vivo*, можно определять стандартными клиническими или лабораторными способами. Кроме того, для помощи в определении оптимальных диапазонов доз необязательно можно проводить анализы *in vitro*. Точная доза для применения в составе также зависит от маршрута введения и тяжести состояния, и ее необходимо устанавливать в соответствии с решением практикующего врача и состояния каждого индивидуума. Эффективные дозы для введения людям или животным можно экстраполировать из кривых зависимостей "доза-эффект", получаемых в тестовых системах *in vitro* или в моделях на животных.

В определенных вариантах осуществления композиции по изобретению, включающие фармацевтические препараты, являются непирогенными. Другими словами, в определенных вариантах осуществления композиции, по существу, не содержат пирогенов. В одном из вариантов осуществления составы по изобретению представляют собой не содержащие пирогенов составы, которые, по существу, не содержат эндотоксинов и/или родственных пирогенных веществ. Эндотоксины включают токсины, которые содержатся внутри микроорганизмов и высвобождаются только при разрушении или гибели микроорганизмов. Пирогенные вещества также включают индуцирующие лихорадку, термостабильные вещества (гликопротеины) из наружной мембраны бактерий и других микроорганизмов. Все эти вещества при введении людям могут вызывать лихорадку, понижение давления и шок. Вследствие возможных неблагоприятных эффектов даже небольшие количества эндотоксинов необходимо удалять из внутривенно вводимых растворов фармацевтических лекарственных средств. Food & Drug Administration ("FDA") для применений внутривенных лекарственных средств установила верхний предел в 5 эндотоксиновых единиц (ЭЕ) на дозу на 1 кг массы тела в течение периода 1 ч (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Когда терапевтические белки вводят в относительно больших дозах и/или в течение длительного периода времени (например, такого как в течение всей жизни пациента), даже небольшие количества вредного и опасного эндотоксина могут быть опасными. В определенных конкретных вариантах осуществления уровни эндотоксинов и пирогенов в композиции составляют менее 10, или менее 5, или менее 1, или менее 0,1, или менее 0,01, или менее 0,001 ЭЕ/мг.

Указанное выше применимо к любому из средств, композиций и способов по изобретению, описываемых в настоящем документе. По изобретению конкретно предусмотрена любая комбинация характеристик средств по изобретению, композиций и способов, описываемых в настоящем документе (отдельно или в комбинации), с характеристиками, описываемыми для различных фармацевтических композиций и маршрутов введения, описанных в этом разделе и выше.

В описании предоставлено множество общих и конкретных примеров средств и категорий средств, пригодных для использования в способах по настоящему изобретению ("средства по изобретению"). По изобретению предусмотрено, что любое из таких средство или категорий средств можно формулировать для введения *in vitro* или *in vivo*, как описано в настоящем документе.

Кроме того, в определенных вариантах осуществления по изобретению предусмотрены композиции, включающие фармацевтические композиции, содержащие любое средство по изобретению, описываемое в настоящем документе, сформулированное с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и/или эксципиентами. Такие композиции можно описать с использованием любой из функциональных и/или структурных характеристик средства по изобретению, приведенных в настоящем документе. Любые такие композиции или фармацевтические композиции можно использовать *in vitro* или *in vivo* в любом из способов по изобретению.

Подобным образом, по изобретению предусмотрено выделенное или очищенное средство по изобретению. Средство по изобретению, описанное на основе любой из функциональных и/или структурных характеристик средства, описываемого в настоящем документе, можно предоставлять в виде выделенного средства или очищенного средства. У таких выделенных или очищенных средств существует множество применений *in vitro* или *in vivo*, включая применение в любом из способов *in vitro* или *in vivo*, описываемых в настоящем документе.

IX. Применения.

Композиции (например, частицы и их фармацевтические композиции), описываемые в настоящем документе, пригодны для ряда диагностических и терапевтических применений. Например, частицы, описываемые в настоящем документе, можно использовать для лечения злокачественной опухоли, детоксикации индивидуума или лечения вирусной или бактериальной инфекции.

Терапевтические применения включают введение одной или нескольких композиций, описываемых в настоящем документе, индивидууму, например человеку, рядом способов, которые частично зависят от маршрута введения. Маршрут может представлять собой, например, внутривенную инъекцию или инфузию (в/в), подкожную инъекцию (п/к), интраперитонеальную (и/п) инъекцию или внутримышечную инъекцию (в/м).

Введение можно проводить, например, посредством местной инфузии, инъекции или посредством имплантата. Имплантат может представлять собой пористый, непористый или гелеобразный материал, включая мембраны, такие как силластовые мембраны или волокна. Имплантат можно конфигурировать для длительного или периодического высвобождения композиции у индивидуума; см., например, публикацию патентной заявки США № 20080241223; патенты США №№ 5501856; 5164188; 4863457 и 3710795; EP488401 и EP 430539, описание каждого из которых полностью включено в качестве ссылки. Композицию можно доставлять индивидууму посредством имплантируемого устройства на основе, например, диффузионных, эродирующих или конвекционных систем, например осмотических насосов, биоразлагаемых имплантатов, электродиффузионных систем, электроосмотических систем, насосов под действием давления паров, электролитических насосов, насосов под действием бурно выделяющихся газов, пьезоэлектрических насосов, систем на основе эрозии или электромеханических систем.

Как используют в настоящем документе, термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" в условиях *in vivo* означает дозу, достаточную для лечения, ингибирования или смягчения одного или нескольких симптомов подвергаемого лечению нарушения или иным образом обеспечивающую желаемое фармакологическое и/или физиологическое действие, например модулирующую (например, усиливающую) иммунный ответ на антиген. Точная доза варьирует в зависимости от ряда факторов, таких как относящиеся к индивидууму переменные (например, возраст, состояние иммунной системы и т.д.), заболевание и проводимое лечение.

Как используют в настоящем документе, млекопитающее может представлять собой человека, не являющегося человеком примата (например, мартышку, бабуина или шимпанзе), лошадь, корову, свинью, овцу, козу, собаку, кошку, кролика, морскую свинку, песчанку, хомяка, крысу или мышь. В определенных вариантах осуществления млекопитающее представляет собой младенца (например, младенца человека).

Как используют в настоящем документе, млекопитающее "нуждающееся в предотвращении", "нуждающееся в лечении" или "нуждающееся в этом" относится к млекопитающему, которое по решению компетентного врача-терапевта (например, практикующих доктора, медицинской сестры или санитаря в случае людей; ветеринара в случае не являющихся человеком млекопитающих) может получить объективный положительный эффект от данного лечения.

Термин "предотвращение" принят в данной области, и когда его используют в отношении патологического состояния, широко распространен в данной области и включает введение композиции, которая снижает частоту или задерживает начало симптомов медицинского состояния у млекопитающего относительно индивидуума, не получающего композиции.

Подходящие для человека дозы любой из композиций, описываемых в настоящем документе, можно дополнительно оценивать, например, в фазе I исследований с увеличением дозы; см., например, van Gorp et al. (2008) *Am. J. Transplantation* 8 (8): 1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin. Cancer. Res.* 13 (2, part 1):523-531 и Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких композиций можно определять известными фармацевтическими способами в культурах клеток или на экспериментальных животных (например, в моделях злокачественных опухолей, токсичности или инфекций на животных). Эти способы можно использовать, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Отношение доз при токсическом и терапевтическом действии представляет собой терапевтический индекс и его можно выражать в виде отношения LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются средства, которые демонстрируют высокий терапевтический индекс. Хотя можно использовать композиции, которые демонстрируют токсические побочные эффекты, следует уделить внимание разработке систем доставки, которые доставляют такие соединения в участок пораженной ткани, и минимизации потенциального повреждения нормальных клеток и, таким образом, снижения побочных эффектов.

Данные, получаемые из анализа культуры клеток и исследований животных, можно использовать для формирования диапазона доз для применения у людей. Как правило, доза таких композиций находится в диапазоне циркулирующих концентраций композиций, который включает ED₅₀ с небольшой или отсутствующей токсичностью. Доза в этом диапазоне может варьировать в зависимости от используемых лекарственной формы и маршрута введения. Исходно терапевтически эффективную дозу можно рассчитывать на основе анализов культур клеток. Дозу можно формировать в моделях на животных с достижением диапазона циркулирующей концентрации в плазме, который включает IC₅₀ (например, концентрация антигена, которая обеспечивает половину максимального ингибирования симптомов), как определено в культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения подходящих доз у людей. Уровни в плазме можно определять, например, посредством высокоэффективной жид-

костной хроматографии. В определенных вариантах осуществления, например, когда желательно местное введение, для определения дозы, необходимой для достижения терапевтически эффективной концентрации в локальном участке, можно использовать культуру клеток или моделирование на животных.

В определенных вариантах осуществления любого из способов, описываемых в настоящем документе, частицы можно вводить млекопитающему в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами (например, терапевтическими средствами для лечения инфекции или лечения злокачественной опухоли).

В определенных вариантах осуществления частицы и дополнительное терапевтическое средство можно вводить млекопитающему с использованием различных маршрутов введения. Например, дополнительное терапевтическое средство можно вводить подкожно или внутримышечно, а частицы можно вводить внутривенно.

Х. Отдельные применения, относящиеся к неоплазиям.

В определенных вариантах осуществления частицы, описываемые в настоящем документе, могут являться пригодными для лечения индивидуума со злокачественной опухолью. Иллюстративные средства, пригодные в композициях частиц, описываемых в настоящем документе, и/или растворимые биомолекулы, которые можно захватывать такими частицами, описаны в настоящем документе (например, в табл. 2) и известны в данной области. Например, частицы, способные к захвату sTNFR, MMP2, MMP9, sIL-2R, рецептора sIL-1 и т.п., пригодны для лечения злокачественной опухоли и/или для усиления иммунного ответа против злокачественной опухоли, облегчая растормаживание иммунной системы.

Подход к иммунотерапии в виде растормаживания иммунной системы частично основан на концепции, что многие пациенты со злокачественными опухолями, как правило, в целом являются иммунологически компетентными, но их иммунные системы локально ингибированы в микроокружении их опухолей. Если это ингибирование иммунной системы снизить посредством введения частиц по изобретению, собственная иммунная система пациента сможет действовать на опухоль. Таким образом, в определенных вариантах осуществления частицы по изобретению обеспечивают способ иммунотерапии без необходимости гиперстимуляции иммунной системы пациента посредством добавления экзогенных активных цитокинов, предназначенных для связывания с рецепторами на клеточной поверхности для вызова иммунного ответа, и/или без гиперстимуляции иммунной системы пациента другим способом.

Практически, так как пациенты со злокачественными опухолями, как правило, являются иммунологически компетентными, способность лимфоцитов распознавать опухолевые антигены в основном не поражена опухолью. Таким образом, лимфоциты входят в микроокружение опухоли, как они бы это делали с любым aberrантным клеточным кластером, после чего цитокины и цитотоксические факторы, такие как фактор некроза опухоли (TNF, такой как TNF альфа, основной цитотоксический "меч" иммунной системы) отщепляются от лимфоцитов в микроокружении. Если клетки вместо злокачественной клетки являются инфицированными вирусами клетками, TNF (такой как TNF альфа) связался бы с рецептором TNF (TNFR) на поверхности инфицированной клетки, что привело бы к быстрому разрушению посредством апоптоза или окислительного стресса в зависимости от связывания рецептора TNF типа R₁ или R₂. Другими словами, в случае нормального иммунного ответа, который не простимулирован присутствием опухоли и/или опухолевых антигенов, TNF, выделяемый лимфоцитами, был бы доступен для связывания с рецепторами TNF (рецепторами R₁ и/или R₂) на клеточной поверхности как часть развития иммунного ответа. Даже в случае опухоли лимфоциты мигрируют в участок опухоли.

Однако многие типы злокачественных клеток действуют отличным от других aberrантных типов клеток, таких как инфицированных вирусами клетки, образом тем, что у них происходит сверхпродукция рецепторов TNF (обоих типов) и выделение их в окружение опухоли. Таким образом, микроокружение злокачественных клеток и/или опухолей содержит определенные количества растворимых рецепторов TNF. Практически, уровни растворимых рецепторов TNF в микроокружении опухолей превосходят уровни, наблюдаемые в микроокружении здоровых клеток, таких как здоровые клетки ткани того же типа. Дополнительно или альтернативно, скорость и количество выделяемого рецептора TNF у злокачественных клеток являются большими, чем у здоровых клеток. Кроме того, практически, уровни растворимых рецепторов TNF, выявляемые в плазме пациентов со злокачественными опухолями, в определенных вариантах осуществления могут являться более высокими, чем у здоровых индивидуумов.

Вне зависимости от механизма в этой модели эти выделяемые растворимые рецепторы TNF связываются с TNF, эндогенно высвобождаемым привлеченными лимфоцитами, нейтрализуют эндогенный TNF и эффективно создают сферу иммунологической привилегированности вокруг опухоли, в которой опухоль продолжает расти и выделять дополнительные рецепторы TNF. Другими словами, выделяемые растворимые рецепторы TNF поглощают TNF альфа, эндогенно продуцируемый лимфоцитами, и предотвращают или ингибируют связывание этого TNF с рецепторами TNF на поверхности злокачественных клеток. Это уменьшает количество или удаляет TNF, доступный для связывания, с рецепторами TNF на поверхности злокачественных клеток. По существу, растворимые рецепторы TNF побеждают в борьбе за связывание с TNF альфа и, таким образом, снижают активность TNF, такого как TNF альфа, в отношении связывания рецепторов TNF на клеточной поверхности.

Подобным образом приведенный выше сценарий может происходить в случае IL-2 и выделяемых

растворимых рецепторов IL-2.

Настоящее изобретение предоставляет фармакологические подходы, которые можно использовать системно или местно для уменьшения ингибирования иммунной системы, вызываемого выделяемыми злокачественной опухолью рецепторами (например, растормаживание иммунной системы). Настоящее изобретение предоставляет способы и композиции для уменьшения количества и/или активности (например, нейтрализующей активность) растворимых рецепторов TNF и/или растворимых рецепторов IL-2 (или любых других растворимых биомолекул, что приводит к растормаживанию иммунной системы), например, в микроокружении злокачественных клеток и опухолей. Практически, уменьшение количества и/или активности, например, растворимых рецепторов TNF (например, так как в микроокружении опухоли) можно использовать в качестве части способа ингибирования пролиферации, роста или выживания клеток, таких как злокачественные клетки. В определенных вариантах осуществления это можно использовать для ингибирования выживания клеток, таких как злокачественные клетки. Иллюстративные способы и средства описаны в настоящем документе.

Регуляторные Т-клетки (TREG) в качестве способа снижения иммунного ответа во избежание, например, аутоиммунного заболевания, вызываемого сверхактивными Т-клетками или продолжительным функционированием Т-клеток, могут секретировать те же лиганды, что и злокачественные клетки. Например, CD80/B7-1 и CD86/B7-2 связываются с рецептором CTLA-4 на Т-клетках и ингибируют активность Т-клеток. Вместо блокирования рецептора CTLA-4 можно сконструировать частицы, описываемые в настоящем документе, для захвата CD80/B7-1 и/или CD86/B7-2. Подобным образом, частицы, описываемые в настоящем документе, можно сконструировать для захвата других ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как PD-1L, например, с использованием частиц, содержащих рецептор PD-1. Такие композиции частиц обеспечивают определенное преимущество по сравнению с другими подходами к стимуляции иммунной системы для лечения злокачественной опухоли.

В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой индивидуум, у которого присутствует как предполагают наличие или существует риск развития злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой индивидуума, у которого присутствует как предполагают наличие или существует риск развития аутоиммунного заболевания.

Как используют в настоящем документе, индивидуум "с риском развития" злокачественной опухоли представляет собой индивидуума с одним или несколькими (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью или восемью или более) факторами риска развития злокачественной опухоли. Например, индивидуум с риском развития злокачественной опухоли может иметь предрасположенность к развитию злокачественной опухоли (например, генетическую предрасположенность к развитию злокачественной опухоли, такую как мутацию в гене опухолевого супрессора (например, мутацию в BRCA1, p53, RB или APC) или подвергается действию условий, которые могут приводить к патологическому состоянию. Таким образом, индивидуум может представлять собой индивидуума "с риском развития злокачественной опухоли", когда индивидуум подвергается действию мутагенных или канцерогенных уровней определенных соединений (например, канцерогенных соединений в сигаретном дыме, таких как акролеин, мышьяк, бензол, бенз[а]антрацен, бензо[а]пирен, полоний-210 (Radon), уретан или винилхлорид). Кроме того, у индивидуума может существовать "риск развития злокачественной опухоли", когда индивидуум подвергается действию, например, больших доз ультрафиолетового света или рентгеновского облучения или подвергается действию (например, инфекции), вызывающему опухоль/ассоциированного с опухолью вируса, такого как вирус папилломы, вирус Эпштейна-Барр, вирус гепатита В или вирус Т-клеточного лейкоза-лимфомы человека. Злокачественные опухоли представляют собой класс заболеваний или нарушений, характеризуемый неконтролируемым делением клеток и их способностью к распространению посредством непосредственного роста в соседнюю ткань посредством инвазии, или посредством имплантации в удаленные участки посредством метастазирования (когда происходит транспорт злокачественных клеток через кровоток или лимфатическую систему). Злокачественные опухоли могут поражать людей всех возрастов, но существует тенденция увеличения риска с возрастом. Типы злокачественных опухолей могут включать, например, рак легких, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы, злокачественную опухоль почки, рак желудка, рак печени, злокачественную опухоль кости, гематологическую злокачественную опухоль, злокачественную опухоль нервной ткани (например, глиобластому, такую как мультиформная глиобластома), меланому, рак щитовидной железы, рак яичника, рак яичка, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак влагалища или рак мочевого пузыря.

Подобным образом, индивидуум с риском развития инфекции представляет собой индивидуума с одним или несколькими факторами риска, которые увеличивают вероятность контакта с патогенными микроорганизмами.

Индивидуум, "у которого предполагают наличие" злокачественной опухоли или инфекции, представляет собой индивидуума с наличием одного или нескольких симптомов злокачественной опухоли или инфекции. Следует понимать, что индивидуумы с риском развития или с подозрением на наличие злокачественной опухоли или инфекции не включают всех индивидуумов рассматриваемого вида.

В определенных вариантах осуществления способы включают определения наличия у индивидуума

злокачественной опухоли или аутоиммунного заболевания.

XI. Отдельные применения, относящиеся к воспалительным и аутоиммунным нарушениям.

В определенных вариантах осуществления частицы, описываемые в настоящем документе, можно использовать для лечения воспалительного нарушения и/или аутоиммунного нарушения. Иллюстративные средства, пригодные в композициях частиц, описываемых в настоящем документе, и/или растворимые биомолекулы, которые можно захватывать такими частицами, описаны в настоящем документе (например, в табл. 2) и известны в данной области. Например, для лечения ряда аутоиммунных и/или воспалительных нарушений пригодными могут являться частицы, способные к захвату цитокинов (например, TNF α или интерлейкинов, таких как IL-2, IL-6 или IL-1) или хемокинов (например, CXCL8 или CXCL1).

В определенных вариантах осуществления аутоиммунное или воспалительное нарушение представляет собой реакцию гиперчувствительности. Как используют в настоящем документе, "гиперчувствительность" относится к нежелательному ответу иммунной системы. Гиперчувствительность разделяют на четыре категории. Гиперчувствительность I типа включает аллергии (например, атопию, анафилаксию или астму). Гиперчувствительность II типа опосредована цитотоксичностью/антителами (например, аутоиммунная гемолитическая анемия, тромбоцитопения, гемолитическая анемия новорожденных или синдром Гудпасчера). Тип III представляет собой заболевания иммунных комплексов (например, сывороточная болезнь, феномен Артюса или SLE). Тип IV представляет собой гиперчувствительность замедленного типа (DTH), опосредованный клетками памяти иммунный ответ и антителонезависимый ответ (например, контактный дерматит, туберкулиновый кожный тест или хроническое отторжение трансплантата). Как используют в настоящем документе, "аллергия" означает нарушение, характеризуемое избыточной активацией тучных клеток и базофилов посредством IgE. В определенных случаях избыточная активация тучных клеток и базофилов посредством IgE приводит к (частичному или полному) воспалительному ответу. В определенных случаях воспалительный ответ является местным. В определенных случаях воспалительный ответ приводит к сужению дыхательных путей (например, бронхоспазм). В определенных случаях воспалительный ответ приводит к воспалению носа (например, риниту). В определенных случаях воспалительный ответ является системным (например, анафилаксия).

XII. Отдельные применения, относящиеся к патогенным организмам и токсинам.

В определенных вариантах осуществления частицы, описываемые в настоящем документе, можно конструировать для связывания с микроорганизмами (например, вирусами или бактериями) или компонентами микроорганизмов, такими как эндотоксины. Таким образом, частицы, описываемые в настоящем документе, могут являться пригодными для лечения, например, инфекционного заболевания (например, вирусного инфекционного заболевания, включая HPV, HBV, вирус гепатита C (HCV), ретровирусы, такие как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вирусы герпеса, такие как вирус Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), HSV-1 и HSV-2 и вирус гриппа. Кроме того, включены бактериальные, грибковые и другие патогенные инфекции, такие как *Aspergillus*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma* и холерный вибрион. Иллюстративные виды включают *Neisseria gonorrhoea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, виды *Streptococcus* группы B, *Micropasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Abisidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*; или грибы, такие как, например, *Paracoccidioides brasiliensis*; или другие патогенные организмы, например *Plasmodium falciparum*. Также включены приоритетные патогенные организмы National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Они включают агенты категории A, такие как *Variola Major* (натуральная оспа), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), *Yersinia pestis* (чума), токсин *Clostridium botulinum* (ботулизм), *Francisella tularensis* (туляремия), филовirusы (геморрагическая лихорадка Эбола, (геморрагическая лихорадка Марбург), аренавирусы (Ласса (лихорадка Ласса), вирус Хуни (аргентинская геморрагическая лихорадка) и родственные вирусы); агенты категории B, такие как *Coxiella burnetti* (лихорадка Q), виды *Brucella* (бруцеллез), *Burkholderia mallei* (cap), альфавирусы (венесуэльский энцефаломиелит, восточный и западный конский энцефаломиелит), рициновый токсин из *Ricinus communis* (клещевина), токсин эпсилон *Clostridium perfringens*; энтеротоксин B *Staphylococcus*, виды *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* штамм 0157:H7, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*; агенты категории C, такие как вирус Нипах, хантавирусы, клещевые вирусы геморрагической лихорадки, вирусы клещевого энцефалита, желтая лихорадка и полирезистентный туберкулез; гельминты, такие как *Schistosoma* и *Taenia*; и простейшие, такие как *Leishmania* (например, *L. mexicana*) и *Plasmodium*.

XIII. Наборы для введения средства.

В определенных вариантах осуществления по изобретению также предоставлен фармацевтический

комплект или набор, содержащий один или несколько контейнеров, заполненных по меньшей мере одной композицией (например, частицей или частицами) по изобретению. Необязательно к этому контейнеру(ам) может быть приложено извещение в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, где в этом извещении приведено: (а) одобрение агентства по производству, использованию или продаже для введения человеку, (б) руководство по использованию, или оба.

В определенных вариантах осуществления набор содержит дополнительные материалы для облегчения доставки средства индивидууму. Например, набор может содержать один или несколько катетеров, трубок, инфузионных пакетов, шприцов и т.п. В определенных вариантах осуществления композицию (например, содержащие частицы, как описано в настоящем документе) упаковывают в лиофилизированной форме, и набор содержит по меньшей мере два контейнера: контейнер, содержащий лиофилизированную композицию, и контейнер, содержащий подходящее количество воды, буфер или другую жидкость, подходящую для восстановления лиофилизированного материала.

Указанное выше применимо для любого из композиций и способов, описываемых в настоящем документе. Изобретение конкретно предусматривает любую комбинацию характеристик таких композиций и способов (отдельно или в комбинации) с характеристиками, описанными для различных наборов, описанных в этом разделе.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут более понятны после рассмотрения приводимых ниже примеров, которые предназначены для иллюстрации определенных конкретных вариантов изобретения, но не предназначены для ограничения его объема, определенного формулой изобретения.

Примеры

Пример 1. Способ лечения злокачественной опухоли.

Врач-терапевт определяет, что у являющегося человеком пациента присутствует злокачественная опухоль (например, рак легких, толстой кишки, молочной железы, головного мозга, печени, поджелудочной железы, кожи или гематологическая злокачественная опухоль), которая выделяет растворимый TNFR или растворимый IL-2R. Пациенту вводят композицию, содержащую частицы (описываемые в настоящем документе), которые связывают и изолируют растворимый TNFR или IL-2R, в количестве, эффективном для лечения злокачественной опухоли. Необязательно, пациенту вводят "поддерживающие дозы" композиции для поддержания ингибирования действия растворимых TNFR или IL-2R и терапию продолжают для усиления у пациента иммунологического надзора против злокачественной опухоли.

Пример 2. Способ детоксикации человека.

У являющегося человеком пациента выявляют симптомы токсичности, ассоциированной с токсичным ботулизмом. Пациенту вводят композицию, содержащую частицы (описываемые в настоящем документе), которые связывают и изолируют растворимый токсин ботулизма, в количестве, эффективном для снижения тяжести одного или нескольких симптомов, ассоциированных с токсичностью.

Пример 3. Способ лечения вирусной инфекции.

Врач-терапевт определяет, что у являющегося человеком пациента присутствует инфекция ВИЧ-1. Пациенту вводят композицию, содержащую частицы (описываемые в настоящем документе), которые связывают и изолируют растворимые вирионы ВИЧ-1, в количестве, эффективном для уменьшения титров вируса в системе циркуляции пациента. Пациенту вводят "поддерживающие дозы" композиции для поддержания снижения титров вирионов ВИЧ-1 и, таким образом, подавляют инфекцию у пациента, а также снижают вероятность передачи вируса другому лицу.

Пример 4. Способ получения силиконовых частиц.

Получают пористые силиконовые диски с размерами 1000 на 400 нм и 1000 на 800 нм с варьирующими размерами пор. Размер и морфологию дисков, а также диаметры пор характеризуют посредством сканирующей электронной микроскопии. В порах пористых силиконовых дисков размещают частицы золота (Au). С поверхностями золотых наночастиц посредством координационных ковалентных связей конъюгируют факторы некроза опухоли (TNF). Оценивают плотность лиганда и стабильность связывания TNF-Au.

Пример 5. Способ получения полимерных частиц.

Посредством эмульгирования получают частицы сополимера лактида с гликолидом (PLGA). Размер и морфологию частиц PLGA характеризуют посредством сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии. Частицы покрывают функционализированным четвертичным аммонием бета-циклодекстрином для привлечения макрофагов (например, фагоцитоза). Покрытие проверяют посредством атомно-силовой микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии. Плотность и однородность покрытия характеризуют посредством трансмиссионной электронной микроскопии и динамического светорассеяния.

Покрытые бета-циклодекстрином частицы PLGA инкубируют с макрофагами и посредством флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии определяют фагоцитоз.

Покрытые бета-циклодекстрином частицы PLGA покрывают смесью полиэтиленгликоля (PEG) и тиоловых молекул для обеспечения предотвращения опсонизации и во избежание захвата макрофагами, а также связывания с другими частицами. Однородность и плотность покрытий PEG и тиолом характери-

зуют посредством атомно-силовой микроскопии. Стабильность покрытий характеризуют посредством инкубации частиц в средах в течение различных периодов времени.

Избегание и захват частиц определяют в различные моменты времени посредством инкубации частиц с макрофагами, как описано выше.

Частицы PLGA покрывают фактором некроза опухоли (TNF) и комбинируют посредством дисульфидных связей с формированием "губки", содержащей TNF на внутренней поверхности губки. Внешняя поверхность губки необязательно блокируют частицами, которые не содержат TNF, для предотвращения взаимодействия между TNF губки и клетками.

Пример 6. Фармакокинетика частиц на полимерной основе.

Губку из примера 5 (например, композицию, содержащую "губки" из примера 5, например от 10^3 до 10^{12} губок) вводят внутривенно или внутрь опухоли в модели первичной и метастатической злокачественной опухоли на мышах, а также здоровым контролям. Токсичность губки определяют, определяя LD_{50} для каждого маршрута введения. Время полужизни губки определяют, определяя концентрацию губок в плазме посредством LC/MS и ICP для каждого маршрута введения. Биораспределение губки определяют, получая биопсию мышей и анализируя ткань на наличие губки и ее компонентов посредством LC/MS, ICP и конфокальной микроскопии.

Пример 7. Эффективность частиц на полимерной основе.

Губку из примера 5 (например, композицию, содержащую "губки" из примера 5, например от 10^3 до 10^{12} губок) вводят мышам, несущим ксенотрансплантаты MDA-MB-231 или 4T1. Модель MDA-MB-231 используют для оценки уменьшения размера и снижения роста опухоли, а модель 4T1 используют для оценки ингибирования метастазов. Губку вводят внутрь опухоли мышам MDA-MB-231 один раз в неделю в течение 6 недель и периодически определяют массу тела и размеры опухолей. Губку мышам 4T1 вводят внутривенно раз в неделю в течение 6 недель и определяют количеством метастаз.

Пример 8. Фармакокинетика и эффективность частиц с силиконовой/золотой основой.

Эксперименты из примеров 6 и 7 повторяют с пористыми силиконовыми частицами из примера 5.

Хотя настоящее изобретение описано с указанием его конкретных вариантов осуществления, специалистам в данной области следует понимать, что можно проводить различные изменения и можно замещать эквиваленты без уклонения от сущности и объема изобретения. Кроме того, можно проводить множество модификаций для адаптации конкретных условий, материала, композиции, способа, этапа или этапов способа к задаче, сущности и объему настоящего изобретения. Все такие модификации предназначены для включения в объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Частица по меньшей мере с одной поверхностью и средством, иммобилизованным на этой поверхности, которое селективно связывается с мишенью, представляющей собой первый участник пары со специфическим связыванием; при этом ингибируется взаимодействие мишени со вторым участником пары со специфическим связыванием,

где средство представляет собой низкомолекулярное соединение, макроциклическое соединение, полипептид, белок, пептид, пептидомиметическое соединение, антитело, связывающий биомолекулу фрагмент антитела, не являющийся антителом каркасный белок, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты,

где мишень выбрана из:

- (i) растворимой биомолекулы,
- (ii) низкомолекулярного соединения, белка или нуклеиновой кислоты,
- (iii) вирусного белка,
- (iv) токсина,
- (v) лиганда рецептора клеточной поверхности и
- (vi) цитозольного рецептора или ядерного рецептора;

частица дополнительно включает множество покрытий или покрывающих молекул, где предпочтительно по меньшей мере одно покрытие из множества покрытий или по меньшей мере одна молекула из множества покрывающих молекул связана с поверхностью; средство иммобилизовано на частице таким образом, что оно имеет сниженную способность связываться с молекулой на поверхности клетки, например, таким образом, что оно имеет сниженную способность связываться с мишенью, экспрессированной на поверхности клетки.

2. Частица по меньшей мере с одной поверхностью и средством, иммобилизованным на этой поверхности,

где средство селективно связывается с мишенью, которая представляет собой первого участника пары со специфическим связыванием;

связывание мишени с частицей ингибирует взаимодействие мишени со вторым участником пары со специфическим связыванием, где средство представляет собой низкомолекулярное соединение, макроциклическое соединение, полипептид, белок, пептид, пептидомиметическое соединение, антитело, свя-

зывающий биомолекулу фрагмент антитела, не являющийся антителом каркасный белок, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты,

где мишень выбрана из:

- (i) растворимой биомолекулы,
- (ii) низкомолекулярного соединения, белка или нуклеиновой кислоты,
- (iii) вирусного белка,
- (iv) токсина,
- (v) лиганда рецептора клеточной поверхности и
- (vi) цитозольного рецептора или ядерного рецептора;

частица является пористой и содержит внешнюю поверхность и внутренние поверхности пор частицы, средство предпочтительно иммобилизовано на внутренних поверхностях и на частице таким образом, что оно имеет сниженную способность связываться с молекулой на поверхности клетки, например, таким образом, что оно имеет сниженную способность связываться с мишенью, экспрессированной на поверхности клетки.

3. Частица по меньшей мере с одной поверхностью и средством, иммобилизованным на этой поверхности,

где средство селективно связывается с мишенью, которая представляет собой первого участника пары со специфическим связыванием;

связывание мишени с частицей ингибирует взаимодействие мишени со вторым участником пары со специфическим связыванием, где средство представляет собой низкомолекулярное соединение, макроциклическое соединение, полипептид, белок, пептид, пептидомиметическое соединение, антитело, связывающий биомолекулу фрагмент антитела, не являющийся антителом каркасный белок, нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты,

где мишень выбрана из:

- (i) растворимой биомолекулы,
- (ii) низкомолекулярного соединения, белка или нуклеиновой кислоты,
- (iii) вирусного белка,
- (iv) токсина,
- (v) лиганда рецептора клеточной поверхности и
- (vi) цитозольного рецептора или ядерного рецептора;

частица включает по меньшей мере один направленный наружу по меньшей мере из одной из ее вершин выступ, где один или несколько выступов расположены и ориентированы для ингибирования: (i) связывания или активации средством, иммобилизованным на поверхности частицы, рецепторного белка клеточной поверхности, и/или (ii) когда мишень связана со средством, взаимодействия мишени и второго участника пары со специфическим связыванием, где мишень является первым участником.

4. Частица по п.3, где средство иммобилизовано на частице так, что оно обладает сниженной способностью к связыванию молекулы на поверхности клетки, и так, что оно обладает сниженной способностью к связыванию с мишенью.

5. Частица по любому из предшествующих пунктов, где средство иммобилизовано на частице так, что происходит стерическое ограничение его связывания с молекулой на поверхности клетки.

6. Частица по любому из предшествующих пунктов, где:

(i) вирусный белок представляет собой структурный белок капсида вируса или белок оболочки вируса,

(ii) токсин представляет собой бактериальный, растительный токсин или зоотоксин,

(iii) низкомолекулярное соединение, белок или нуклеиновая кислота представляют собой растворимую форму мембраносвязанного клеточного белка, такого как рецепторный белок клеточной поверхности,

(iv) лиганд рецептора клеточной поверхности представляет собой цитокин, хемокин или лимфокин, такой как белок интерлейкин или хемокин,

(v) лиганд рецептора клеточной поверхности представляет собой лиганд семейства фактора некроза опухоли (TNF) или его вариант, такой как TNF α или его вариант или Fas-лиганд, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TLA1, TWEAK, TNF β , TRAIL или вариант любого из указанных выше.

7. Частица по любому из предшествующих пунктов, где средство представляет собой лиганд рецепторного белка клеточной поверхности, такой как природный лиганд рецепторного белка клеточной поверхности.

8. Частица по п.7, где средство иммобилизовано на частице так, что происходит стерическое ингибирование его связывания или активации рецепторного белка клеточной поверхности на поверхности клетки.

9. Частица по меньшей мере с одной поверхностью и средством, иммобилизованным на этой поверхности,

где средство селективно связывается с растворимой биомолекулой;
растворимая биомолекула представляет собой форму рецепторного белка клеточной поверхности;
при этом

средство иммобилизовано на частице так, что происходит стерическое ингибирование его связывания или активации рецепторного белка клеточной поверхности на поверхности клетки.

10. Частица по любому из пп.7-9, где рецепторный белок клеточной поверхности экспрессирован раковой клеткой, такой как белок, выделяемый раковой клеткой в виде растворимой формы рецепторного белка клеточной поверхности.

11. Частица по любому из пп.7-10, где рецепторный белок клеточной поверхности при активации индуцирует апоптоз, такой как:

(i) белок рецептора фактора некроза опухоли (TNFR),

(ii) белок рецептора Fas,

(iii) белок рецептора родственного TNF индуцирующего апоптоз лиганда (TRAILR), белок рецептора 4-1BB, белок CD30, белок рецептора EDA, белок HVEM, белок рецептора лимфотоксина бета, белок DR3 или белок рецептора TWEAK.

12. Частица по любому из пп.7-10, где рецепторный белок клеточной поверхности представляет собой белок рецептора интерлейкина, такой как белок рецептора IL-2.

13. Частица по п.9, где средство:

(i) представляет собой антитело или связывающий биомолекулу фрагмент антитела, такой как связывающий биомолекулу фрагмент антитела, и связывающий биомолекулу фрагмент выбран из фрагмента Fab, фрагмента F(ab)₂, фрагмента scFv и доменного антитела,

(ii) представляет собой не являющийся антителом каркасный белок,

(iii) представляет собой белок интерлейкин или его вариант, такой как белок IL-2 или его вариант,

(iv) содержит лиганд семейства фактора некроза опухоли (TNF) или его вариант, где лиганд семейства TNF представляет собой, например, TNF α или его вариант, такой как Fas-лиганд, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TLA1, TWEAK, TNF β , TRAIL или вариант любого из указанных выше, или

(v) содержит нуклеиновую кислоту или ее аналог в виде аптамера.

14. Частица по любому из пп.7-13, где средство обладает сниженной относительно способности природного лиганда рецепторного белка клеточной поверхности способностью активировать рецепторный белок клеточной поверхности и не активирует рецепторный белок.

15. Частица по любому из пп.7-14, где средство не активирует рецепторный белок клеточной поверхности.

16. Частица по любому из предшествующих пунктов, где частица является сферической и дополнительно содержит две пересекающиеся борозды, идущие от сферической поверхности частицы, и где борозды расположены и ориентированы для ингибирования: (i) связывания или активации средством, иммобилизованным на поверхности сферической частицы, рецепторного белка клеточной поверхности, и/или (ii) когда мишень связана со средством, взаимодействия мишени и второго участника пары со специфическим связыванием, в которой мишень является первым участником.

17. Частица по любому из предшествующих пунктов, где частице придана форма и размер для циркуляции в сосудистой системе индивидуума.

18. Частица по любому из предшествующих пунктов, где наибольший размер частицы не превышает приблизительно 1 мкм, такой как не более 750 нм, такой как не более 500 нм.

19. Частица по любому из предшествующих пунктов, где наименьший размер частицы составляет по меньшей мере приблизительно 300 нм.

20. Частица по любому из предшествующих пунктов, где множество средств состоит из количества от 10 до 10⁹, от 10³ до 10⁷, от 10⁴ до 10⁶ средств.

21. Частица по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая множество покрытий или покрывающих молекул, где по меньшей мере одно покрытие из множества покрытий или по меньшей мере одна молекула из множества покрывающих молекул связана с поверхностью.

22. Частица по п.21, где множество покрывающих молекул ингибирует взаимодействие между средством и молекулами на клеточной поверхности.

23. Частица по п.21 или 22, дополнительно содержащая вторую поверхность, где по меньшей мере одна молекула из множества покрывающих молекул связана со второй поверхностью.

24. Частица по п.23, где поверхность представляет собой внутреннюю поверхность частицы, а вторая поверхность представляет собой внешнюю поверхность частицы.

25. Частица по п.24, дополнительно содержащая второе множество покрывающих молекул, где по меньшей мере одна молекула из второго множества покрывающих молекул связана со второй поверхностью и

второе множество покрывающих молекул снижает выведение частицы *in vivo*.

26. Частица по п.25, где второе множество покрывающих молекул ингибирует взаимодействия

множества покрывающих молекул и клеток и/или внеклеточных белков, снижая выведение частицы *in vivo*.

27. Частица по п.26, где второе множество покрывающих молекул содержит биоразлагаемый полимер.

28. Частица по любому из пп.21-27, где множество покрывающих молекул увеличивает выведение частицы *in vivo*.

29. Частица по п.28, где множество покрывающих молекул увеличивает выведение частицы посредством фагоцитоза, почками или гепатобилиарной системы.

30. Частица по п.29, где множество покрывающих молекул или покрытий снижает выведение частицы *in vivo*.

31. Частица по п.30, где множество покрывающих молекул содержит биоразлагаемый полимер.

32. Композиция, содержащая множество частиц по любому из предшествующих пунктов для применения для изготовления лекарственного средства для ингибирования биологической активности растворимой биомолекулы у субъекта.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и частицу по любому из пп.1-31 или композицию по п.32 для применения для изготовления лекарственного средства для ингибирования биологической активности растворимой биомолекулы у субъекта.

34. Применение множества частиц по любому из пп.1-31 или применение фармацевтической композиции по п.33 для изготовления лекарственного средства для ингибирования биологической активности растворимой биомолекулы у субъекта.

35. Применение множества частиц по любому из пп.1-31 для изготовления лекарственного средства для лечения индивидуума, пораженного раком, содержащего раковые клетки, выделяющие растворимую форму по меньшей мере одного рецептора цитокинов.

36. Применение по п.29, где раковые клетки выделяют растворимую форму рецептора TNF.

37. Применение по п.35 или 36, где множество частиц включает средство, содержащее полипептид TNF α или его вариант.

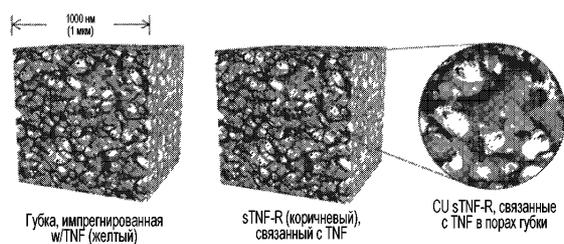
38. Применение по п.35, где раковые клетки выделяют растворимую форму белка рецептора интерлейкина, такого как рецептор IL-2.

39. Применение по п.35 или 38, где множество частиц содержит средство, содержащее полипептид IL-2 или его вариант.

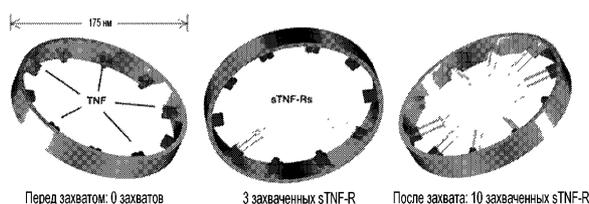
40. Применение по любому из пп.34-39, где субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

41. Применение по пп.34-39, где у субъекта диагностирована злокачественная опухоль или аутоиммунное заболевание.

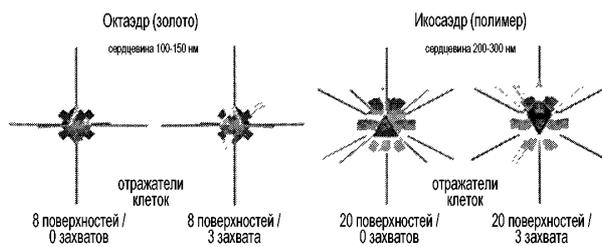
42. Частица по п.5, где средство иммобилизовано на частице таким образом, что оно стерически ингибировано от связывания с мишенью на поверхности клетки.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

