

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091438 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.12.11

(22) Дата подачи заявки
2019.01.16

(51) Int. Cl. *A61K 47/54* (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) НАЦЕЛИВАНИЕ НА ЛАНГЕРИН⁺ КЛЕТКИ

(31) 18152362.2; 18162955.1

(32) 2018.01.18; 2018.03.20

(33) EP

(86) PCT/EP2019/051055

(87) WO 2019/141731 2019.07.25

(71) Заявитель:

МАКС-ПЛАНК-ГЕЗЕЛЬШАФТ
ЦУР ФЁРДЕРУНГ ДЕР
ВИССЕНШАФТЕН Е.В.;
ГУМБОЛЬДТ-УНИВЕРЗИТЕТ ЦУ
БЕРЛИН (DE)

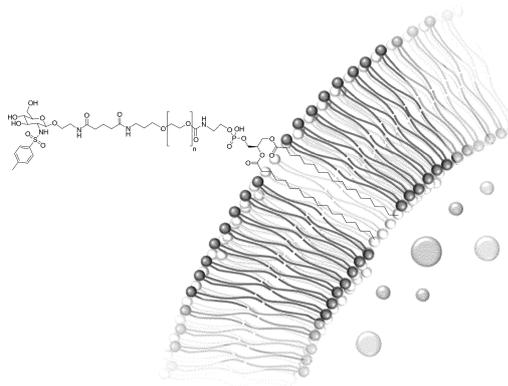
(72) Изобретатель:

Радемахер Кристоф (DE), Вамхоф
Айке-Кристиан (US), Шульце
Джессика, Вавжинек Роберт Карстен
Вилли, Сайц Оливер, Бахем Гуннар
(DE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к применению средства для переноса для специфического молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, причем указанное средство для переноса способно специфично связываться с лангерин⁺ клеткой, при этом указанное средство для переноса содержит (a) по меньшей мере один носитель и (b) по меньшей мере один конъюгат на основе сахаридной группы для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку, а также к фармацевтическим композициям и вариантам применения, включающим средство для переноса согласно настоящему изобретению.



A1

202091438

202091438

A1

НАЦЕЛИВАНИЕ НА ЛАНГЕРИН⁺ КЛЕТКИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к применению средства для переноса для специфического молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, причем указанное средство для переноса способно специфично связываться с лангерин⁺ клеткой, при этом указанное средство для переноса содержит (а) по меньшей мере один носитель и (b) по меньшей мере один конъюгат на основе сахаридной группы для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку. Настоящее изобретение также относится к соответствующим фармацевтическим и диагностическим композициям, а также к вариантам применения, включающим средство для переноса согласно настоящему изобретению, а также к способам, включающим указанное средство для переноса.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Кожа представляет собой мягкую ткань, покрывающую позвоночных животных. У млекопитающих кожа представляет собой орган покровных систем, содержащий нескольких слоев эктодермальной ткани, включая эпидермис, который обеспечивает защиту от влаги и действует как барьер против инфекций; и дерму, которая представляет собой бедный клетками слой, состоящий из фибробластов, которые вырабатывают внеклеточный матрикс, содержащий протеогликаны и переплетенные коллагеновые и эластиновые волокна, при этом оба слоя разделены базальной мембраной – слоем из волокон, который контролирует перемещение клеток и молекул между дермой и эпидермисом и обеспечивает необходимые факторы для процессов ремоделирования или восстановления. Следовательно, кожа контактирует с внешним миром и поэтому подвергается воздействию не только физического стресса, но также различных антигенов окружающей среды, включая химические вещества, бактерии и патогены.

[0003] Соответственно, иммунная система кожи должна быть готова к детектированию и установлению различий между различными антигенами и должна быть способна индуцировать соответствующие реакции, такие как толерогенные или защитные иммунные ответы. Для выполнения этой функции кожа содержит гетерогенную популяцию дендритных клеток (ДК), которые являются ключевыми регуляторами иммунных ответов. Дендритные клетки обычно определяют как популяцию антигенпрезентирующих клеток, координирующих взаимодействие между врожденным иммунитетом и адаптивным иммунитетом, которые являются единственными клетками, способными индуцировать первичные иммунные ответы. Таким образом, ДК представляют собой перспективную мишень в стратегиях иммунотерапии. У человека

было описано несколько типов ДК, которые могут быть классифицированы в соответствии с их тканевым распределением. Было установлено, что некоторые из этих типов ДК способны перекрестно презентировать экзогенные антигены, ассоциированные с опухолью, за счет ГКГС-I и эффективно праймировать наивные CD8⁺ Т-клетки. Дендритные клетки кожи играют решающую роль в защите организма хозяина от вторгающихся патогенов, но также ограничивают повреждение сопутствующих тканей. Кроме того, они ассоциированы с нарушением периферической толерантности, что приводит к хроническим иммуноопосредуемым воспалительным заболеваниям, таким как аллергический контактный дерматит и псориаз (Clausen and Stoitzner, 2015, *Frontiers in Immunology*, 6, Article 534).

[0004] ДК можно подразделить на обычные ДК и плазмацитоидные ДК (пДК). Здоровая кожа не содержит или содержит в небольшом количестве пДК, которые проникают только в воспаленную кожу, чтобы стимулировать заживление ран посредством интерферонов типа I или опосредовать провоспалительную реакцию, которая развивается после стимуляции TLR7, например, при псориазе. В стационарном состоянии обычные ДК, находящиеся в коже, как правило, не являются неактивными, но – как незрелые клетки – постоянно тестируют окружающую их среду для обнаружения вторгающихся патогенов и непрерывно проверяют собственные антигены и антигены окружающей среды. При созревании ДК мигрируют в лимфатические узлы, дренирующие кожу, и отделяются от окружающих кератиноцитов. Во время своей миграции в области локальных лимфатических узлов, где находятся Т-клетки, клетки активируют поверхностную экспрессию комплексов ГКГС/пептид для распознавания антигенспецифичных наивных Т-клеток и взаимодействия с ними. При встрече с потенциально аутореактивными Т-клетками, которые избежали центральной толерантности, или с Т-клетками, распознающими пептиды, происходящие из безвредных чужеродных антигенов, эти ДК индуцируют анергию Т-клеток или делеционную Т-клеточную толерантность (функция, вызывающая толерантность).

[0005] Помимо этого частые контакты Т-клеток с ДК во время сканирования Т-клеток дендритными клетками в лимфоидных органах, т. е. в отсутствие когнатного антигена, индуцируют исходный уровень активации в Т-клетках, необходимый для быстрой ответной реакции на последующие встречи с чужеродным антигеном во время воспаления. Вторжение патогенов наряду с провоспалительными сигналами, как правило, запускают полноценное функциональное созревание дендритных клеток кожи. Помимо программы гомеостатической дифференцировки клетки в данном случае также активируют экспрессию костимулирующих молекул и, в частности, провоспалительных

цитокинов. Все это в совокупности стимулирует размножение клонов наивных антигенспецифичных Т-клеток и дает команду Т-клеткам приобретать соответствующие эффекторные функции, специально предназначенные для устранения вторгающегося патогена (сенсibiliзирующая функция). Таким образом, незрелые ДК на периферии выполняют сторожевую функцию и способны захватывать антиген, осуществлять процессинг антигена и ассоциацию пептид-ГКГС. Они также выполняют миграционную функцию и обеспечивают транспорт антигена к лимфатическим узлам. В этих узлах взаимодействие ДК-Т-клетка приводит к высоким уровням комплексов ГКГС I и II/пептид на поверхности, что в конечном итоге приводит к передаче команды Th1/Th2/Th17, или к устранению и анергии Т-клеток или активации цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, киллерные Т-клетки).

[0006] Согласно современным сообщениям (Doebel et al., 2017, Trends Immunol, 38, 11, 817-828) группы дендритных клеток в коже можно разделить на несколько подгрупп ДК. Дендритные клетки могут представлять собой либо эпидермальные клетки Лангерганса (LC), либо дермальные ДК. Дермальные ДК составляют лангерин⁺ и лангерин⁻ подтипы, т. е. клетки, которые экспрессируют лектин С-типа лангерин (также известный как CD207) на своей поверхности или не экспрессируют его. Лангерин⁺ дермальные ДК подразделяются на группы CD103⁺ и CD103⁻ (Yamazaki and Morita, 2013, Frontiers in Immunology, 4, Article 151) в соответствии с экспрессией CD103, т. е. интегрин-альфа Е (ITGAE). Дальнейшее разделение на подгруппы определяет ДК как популяции лангерин⁺ CD11b^{low}, лангерин⁻ CD11b⁻ и лангерин⁻ CD11b⁺ (Yamazaki and Morita, 2013, Frontiers in Immunology, 4, Article 151).

[0007] Известно, что лангерин участвует в Ca²⁺-зависимом распознавании как ассоциированных с патогеном, так и ассоциированных с собственными клетками гликанов, а также гепариноподобных олигосахаридов (Munoz-Gracia et al., J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 12, 4100-10). Кроме того, лангерин связывается с гликанами, такими как олигосахариды, сульфатированные у 6 положения галактозы, включая кератансульфат (Tateno et al., Journal of Biological Chemistry, 2010, 283, 9, 6390-6400). Поскольку лангерин демонстрирует профиль экспрессии, очень ограниченный конкретными подтипами ДК, в основном в коже, он представляет собой привлекательную мишень для разработки вакцины или создания новых видов иммунотерапии.

[0008] Соответственно, кожа является особенно привлекательной отправной точкой для вакцин или других видов иммунотерапии благодаря экспрессирующим лангерин ДК, находящимся в самом верхнем слое, которые позволяют осуществлять локальное применение вакцины или лекарственного средства с потенциальными системными

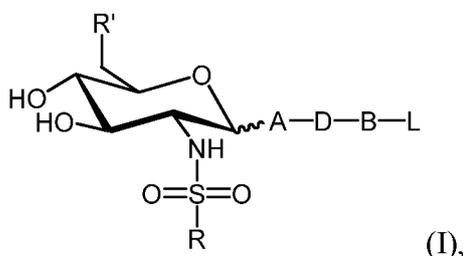
ответами, а также без использования игл. Стратегии, которых потенциально можно придерживаться, включают обеспечение противораковых вакцин, профилактических вакцин против вирусных или бактериальных инфекций, разных видов иммунотерапии против аллергий, лечение аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка, или применение регенеративных подходов применительно к трансплантациям кожи.

[0009] Однако лангерин⁺ ДК с трудом поддаются специфичному нацеливанию, поскольку сайты связывания углеводов лектинов С-типа сильно подвержены воздействию растворителя и гидрофильны. Следовательно, взаимодействия с моно- и олигосахаридами, как правило, характеризуются низкой аффинностью в миллимолярном диапазоне. Кроме того, процесс распознавания очень беспорядочный, поскольку отдельные лектины С-типа связывают несколько моно- или олигосахаридов и наоборот. В этом отношении в Aretz et al., 2014 отмечено, что основанный на структуре анализ *in silico* 21 рентгеновской структуры подтвердил классификацию лектинов С-типа как недостижимых или сложных мишеней. Достижимые вторичные связывающие карманы, прилегающие к сайту связывания углеводов, были идентифицированы исключительно для лектинов С-типа, имеющих ограниченное терапевтическое значение (Aretz et al., 2014, Front Immunol, 5, Article 323). С другой стороны, существуют успешные подходы, основанные на способе *ex vivo*, в котором дендритные клетки-предшественники были выделены у пациента, дифференцированы *ex vivo* и впоследствии загружены частицами SPIO (Verdijk et al., 2006, Int. J. Cancer, 120, 978-984). Однако недостатком этой схемы является высокая стоимость и низкая эффективность, в частности, из-за отсутствия миграции клеток из места инъекции в ткань-мишень и незначительной дифференцировки клеток. Другие альтернативные способы основаны на применении антител. Например, в Flacher et al., 2010, Journal of Investigative Dermatology, 130, 755-762 описан захват и презентация антигенов из антител, нацеленных на лангерин, в эпидермальных клетках Лангерганса. Тем не менее, антитела не отделяются сами от рецептора после эндоцитоза и, таким образом, могут ограничивать абсорбционную способность клеток. Более того, из-за своей высокой аффинности антитело также может связываться с клетками с очень низкой экспрессией рецептора.

[00010] Следовательно, существует потребность в подходе, который позволяет осуществлять эффективное нацеливание на лангерин⁺ дендритные клетки, в частности, в коже, и который дополнительно обеспечивает функциональное и надежное проникновение и последующий процессинг веществ, например, антигенов, в клетке.

ОБЪЕКТЫ И СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00011] Настоящее изобретение удовлетворяет упомянутые потребности и обеспечивает применение средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, причем указанное средство для переноса способно специфично связываться с лангерин⁺ клеткой, при этом указанное средство для переноса содержит (а) по меньшей мере один носитель и (b) по меньшей мере один конъюгат общей формулы (I)



в которой

(i) R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила;

причем указанные заместители независимо выбраны из группы, состоящей из -N(R^a)(R^b), -OR^a, -SR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)(R^b), -N(R^a)C(O)R^b, -N(R^a)S(O)₂R^b, -OS(O)₂R^a, галогена, -NO₂, -CN, -NC, -N₃, -NCO, -OCN, -NCS, -SCN, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, арила и гетероарила;

где R^a и R^b независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₈ алкила, C₂₋₈ алкенила, C₂₋₈ алкинила, C₃₋₆ циклоалкила, арил-C₁₋₅ алкила, гетероарил-C₁₋₅ алкила, арила, гетероарила;

(ii) R' независимо выбран из группы, состоящей из -OR^a и -NHS(O)₂R^a,

где R^a определен выше; и в которой

(iii) A-D-B-L представляет собой линкерную группу, ковалентно связывающую производное глюкозы формулы (I) с носителем или с частью носителя, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку.

[00012] Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что средство для переноса, описанное выше, специфично связывается с лангерин⁺ клетками и эффективно доставляет груз, т. е. вещества различного размера и характера, в лангерин⁺ клетку, которая, в свою очередь, может презентировать интернализированные вещества, например, антигены, на своей поверхности. Лангерин особенно подходит для опосредуемого рецепторами поглощения частиц

в эндосомальные компартменты, что обеспечивает иммунный ответ CD8⁺ Т-клеток, подходящий для противораковой и противовирусной терапии благодаря перекрестной презентации антигенов за счет молекул ГКГС I на поверхности клеток-мишеней. Фактически, основная сложность настоящего изобретения заключалась в разработке структуры лиганда, которая приемлемым образом связывает лектин С-типа лангерин. Фактически, до сих пор не удавалось нацелено воздействовать на сайт связывания специфичного для клеток Лангерганса маркера, лангерина, который представляет собой сахаросвязывающий белок, в основном из-за сложной архитектуры и низкой доступности для соединений, сходных с лекарственными средствами, как сообщалось в общих чертах для связывающих углеводов белков в Ernst and Magnani, 2009, Nat Rev Drug Disc, 8(8), 661-77. Правильный выбор связывающего кармана и ассоциированного механизма для высвобождения груза в эндосомальном компартменте клеток были важными факторами успеха. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что при высвобождении груза под влиянием кислотности и концентрации кальция в клетке рецептор может предпочтительно доставить больше частиц в клетку. Предложенный согласно настоящему изобретению лиганд лангерина, как часть описанного выше средства для переноса, был получен в результате рационального конструирования лиганда, чтобы соответствовать критериям долговечности, масштабируемости, доступности синтеза, достаточной аффинности и специфичности для целевого рецептора, а также достаточной гидрофильности, чтобы избежать нежелательного взаимодействия, такого как поверхностная агрегация, с носителем. Для получения структуры лиганда, описанной в настоящей заявке, применяли компьютеризированные способы, а также инновационные способы конструирования лекарственных средств на основе фрагментов.

[00013] Применение описанного выше предпочтительного лиганда в подходе, основанном на доставке груза в лангерин⁺ клетки, впервые позволяет применить нацеленные трансдермальные и внутрикожные лекарственные формы, которые значительно повышают приверженность пациента лечению (благодаря возможности безыгольного применения), и в то же время обеспечивает более дешевые вакцины. В результате специфичного нацеливания на специализированные дендритные клетки в настоящее время можно инициировать иммунный ответ *in vivo* на введенный груз, например, в виде терапевтических или профилактических вакцин, или уменьшить иммунный ответ, например, благодаря индукции периферической или центральной толерантности. Другое предпочтительное применение представляет собой

непосредственную модуляцию нарушенной регуляции функции клеток Лангерганса, которая проявляется при некоторых аутоиммунных заболеваниях и гистиоцитозе из клеток Лангерганса, т. е. раковом изменении в клетках Лангерганса. Таким образом, до сих пор проблематичная среда кожи, как правило, содержащая несколько конкурирующих групп клеток, сложность которой часто снижала эффективность подходов к вакцинации, поскольку, например, активные ингредиенты не достигали предусмотренных дендритных клеток и даже могли вызывать нежелательные побочные эффекты в результате непреднамеренного включения в иммунные клетки, в настоящее время становится превосходной и очень перспективной областью иммунологических и медицинских процессов.

[00014] Помимо этого благодаря универсальной концепции груз-носитель согласно настоящему изобретению, которая реализована на основе связывания инновационного конъюгата, содержащего лиганд, и носителя, становится возможным введение разнообразной группы различных веществ (грузов) в лангерин⁺ клетки. Таким образом, в клетку могут быть введены не только белки, связанные с антителами, как описано в предшествующем уровне техники, но также вещества, такие как нуклеиновые кислоты, например, ДНК или РНК, гликозилированные элементы, стимуляторы, независимые пептиды или любое низкомолекулярное соединение. Это позволяет значительно увеличить вариабельность с точки зрения клеточной и иммунологической модуляции и вызова иммунных ответов. Более того, это единственная система, которая обеспечивает одновременную доставку различных молекул и может таким образом модулировать разные ветви адаптивной иммунной системы, т. е. антитела и цитотоксические Т-лимфоциты одновременно.

[00015] Кроме того, концепция груз-носитель согласно настоящему изобретению подразумевает высокую гибкость и адаптивность средства для переноса (лиганд-конъюгат плюс носитель) и груза. Это приводит к быстрым и экономически эффективным вариантам адаптации и оптимизации во время разработки продукта. Другие системы, такие как системы на основе антител, являются менее гибкими и требуют высоких затрат вследствие длительного времени разработки и изготовления. Таким образом, нацеленная доставка в комбинации с дермальным введением не только повышает эффективность и безопасность за счет снижения лекарственной нагрузки, но также позволяет улучшить дозировку и избежать системного введения лекарственного средства. Кроме того, предмет настоящего изобретения позволяет обеспечить варианты лечения без индукции нежелательных ответов антител. Также совместное введение адъювантов и антигенов, предусмотренное согласно настоящему изобретению, позволяет избежать системной

активации иммунной системы. Более того, настоящее изобретение позволяет комбинировать различные грузы для одной и той же или для разных мишеней, что может усиливать модуляцию иммунных ответов посредством разных путей.

[00016] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения средство для переноса согласно настоящему изобретению, определенное в настоящей заявке выше, имеет общую формулу (I), в которой R' представляет собой -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃ или -NHS(O)₂R^a.

[00017] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой R' представляет собой -OH или -NHS(O)₂R^a.

[00018] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой R' представляет собой -OH, -NHS(O)₂CH₃ или N-тозил.

[00019] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой R' представляет собой -OH.

[00020] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения средство для переноса, описанное выше, имеет указанную общую формулу (I), в которой R независимо выбран из группы, состоящей из:

замещенного или незамещенного алкила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила.

[00021] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой R независимо выбран из группы, состоящей из:

замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила, C₃-C₆ циклоалкила, C₁-C₃ алкила C₃-C₆ циклоалкила, C₆-C₁₄ арила, C₁-C₃ алкила C₆-C₁₄ арила, гетероарила, C₁-C₃ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₃ алкилбиарила.

[00022] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой R независимо выбран из группы, состоящей из:

замещенного или незамещенного циклогексила, фенила, бензила, бифенила, пиридила и оксазолила.

[00023] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет указанную общую формулу (I), в которой R представляет собой

замещенный или незамещенный фенил.

[00024] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой заместители R независимо выбраны из группы, состоящей из:

$-N(R^a)(R^b)$, $-OR^a$, $-SR^a$, $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)N(R^a)(R^b)$, $-N(R^a)C(O)R^b$, $-N(R^a)S(O)_2R^b$, $-OS(O)_2R^a$, галогена, $-NO_2$, $-CN$, $-NC$, $-N_3$, $-NCO$, $-OCN$, $-NCS$, $-SCN$, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, арила и гетероарила,

где R^a и R^b независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и C_{1-2} алкила.

[00025] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой заместители R независимо выбраны из группы, состоящей из:

$-NH_2$, $-OH$, $-OCH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHC(O)CH_3$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-NO_2$, $-CN$, C_1-C_4 алкила и фенила.

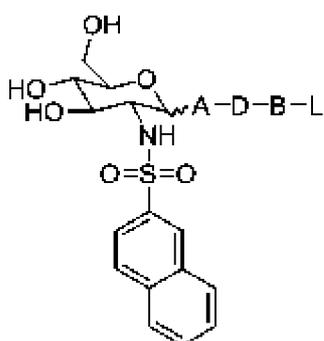
[00026] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет указанную общую формулу (I), в которой указанный фенил является моно-, ди- или тризамещенным, а заместители фенила независимо выбраны из группы, состоящей из:

$-NH_2$, $-OH$, $-OCH_3$, $-C(O)CH_3$, $C(O)NH_2$, $-C(O)NHCH_3$, $-CH_2OH$, $-NHC(O)CH_3$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-NO_2$, $-CN$, C_1-C_4 алкила, нафтила и фенила.

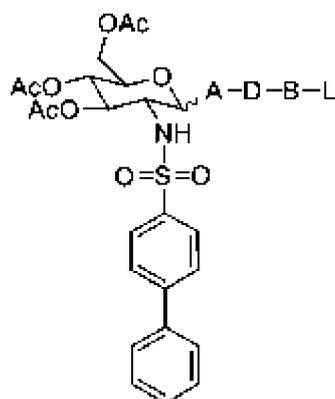
[00027] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой указанный фенил является монозамещенным в пара-положении, а заместители фенила независимо выбраны из группы, состоящей из

$-NHC(O)CH_3$, $-CN$, $-CH_3$ и фенила.

[00028] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат, упомянутый выше, представляет собой конъюгат следующей формулы (I-1) или (I-2):

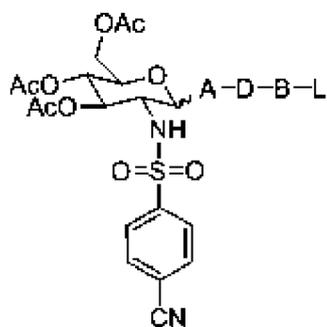


(I-1)

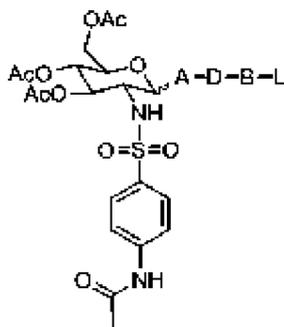


(I-2).

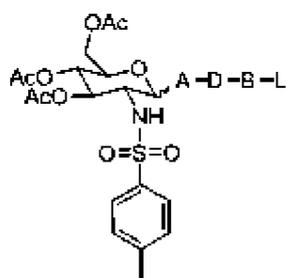
[00029] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат, упомянутый выше, представляет собой конъюгат любой из следующих формул (I-3)-(I-15):



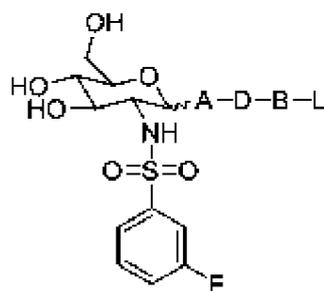
(I-3),



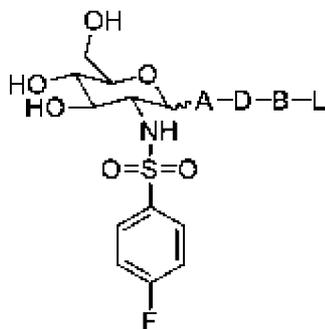
(I-4),



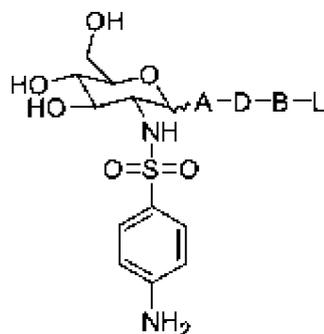
(I-5),



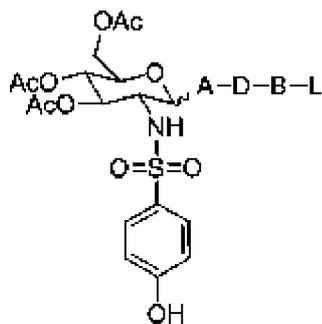
(I-6),



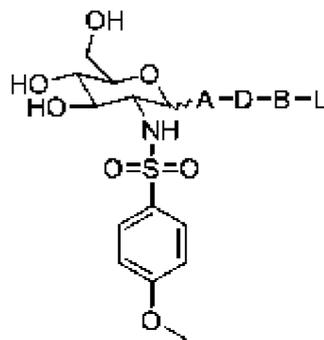
(I-7),



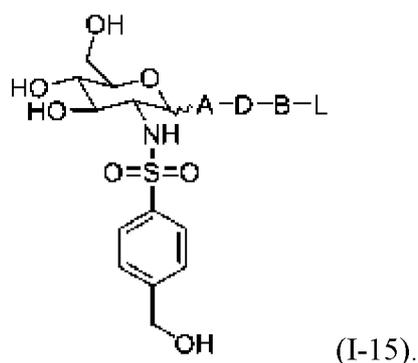
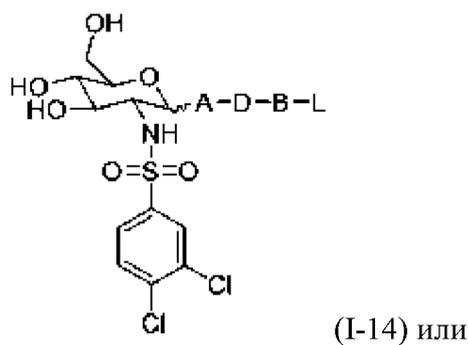
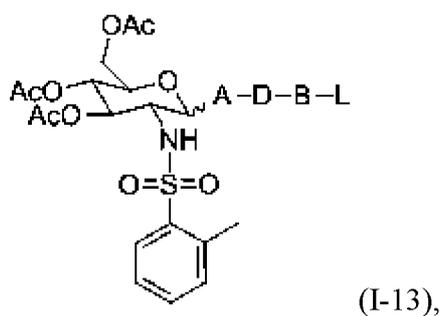
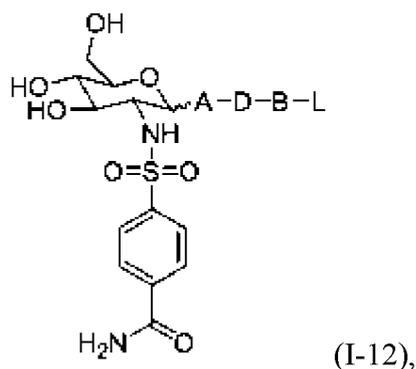
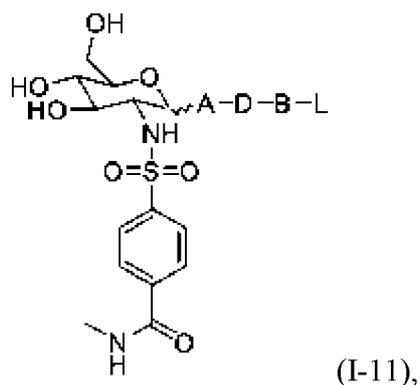
(I-8),



(I-9),



(I-10),



[00030] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная линкерная группа A-D-B-L, упомянутая выше, представляет собой группу, состоящую из спейсера A-D-B и линкера L, соединяющую производное глюкозы с носителем. Особенно предпочтительно указанный линкер L содержит один или более из синтетических полимеров или природных полимеров или одно или более отдельных звеньев этих полимеров или их комбинацию.

[00031] В соответствии с другими предпочтительными вариантами реализации настоящего изобретения указанный синтетический полимер, упомянутый выше, выбран из группы, состоящей из насыщенного и ненасыщенного углеводородного полимера; полиаминов; полиамида; сложного полиэфира; простого полиэфира, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля; блок-сополимеров и полуксамеров.

[00032] Согласно другой группе предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения указанный природный полимер, упомянутый выше, выбран из группы, состоящей из углеводов, модифицированных углеводов, пептидов, модифицированных пептидов, липидов и модифицированных липидов.

[00033] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения средство для переноса согласно настоящему изобретению, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой

D представляет собой спейсер, соединенный с A и B общей формулы (D-1)



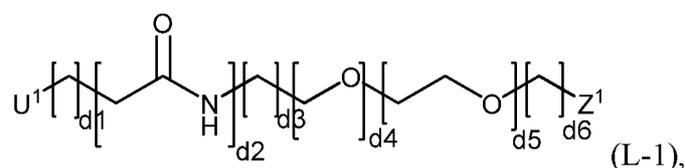
причем D соединен с линкером L за счет B, при этом B выбран из группы, состоящей из: -O-, -S-, -C(R^{c1})(R^{c2})-, -S-S-, -N(R^{c1})-, -C(O)-, -C(R^{c1})=N-, -N=N-, -OC(O)-, -C(O)O-, -C(O)N(R^{c1})-, -N(R^{c1})C(O)-, -N(R^{c1})C(O)N(R^{c2})-, -N(R^{c1})C(S)N(R^{c2})-, -N(R^{c1})C(O)O-, -OC(O)N(R^{c1})-, -циклогексен- и -триазолов-;

где R^{c1} и R^{c2} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила и C₁-C₈ алкилгетероарила;

D соединен с производным глюкозы за счет A, при этом A выбран из группы, состоящей из -O CH₂-, -S-, -NH-, -NHC(O)-, -OC(O)-, -циклогексен- и -триазолов-; и

c представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20, c₁ представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20, а c₂ представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20, c₃ представляет собой целое число, выбранное от 1 до 20, если A представляет собой -CH₂-, c₃ представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20.

[00034] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, имеет общую формулу (I), в которой линкер L представляет собой линкер следующей общей формулы (L-1)



в которой

U¹ представляет собой группу, соединенную за счет B со спейсером D, при этом U¹ выбран из группы, состоящей из -CH₂-, -CH=CH- или -C≡C-;

Z¹ представляет собой группу, связывающую линкер с носителем, выбранную из группы, состоящей из -O-, -S-, -N(R^d)-, -C(R^d)(R^e)-, -R^dC=CR^e-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)S-, -

$C(O)N(R^d)-$, $-N(R^d)C(O)-$, $-N(R^d)C(O)N(R^e)-$, $-N(R^d)C(S)N(R^e)-$, $-N(R^d)C(O)O-$, $-OC(O)N(R^d)-$,
, -циклогексен-, -триазолов-, $-NHS(O)_2-$, $-S(O)_2-$, $-OP(O)(H)O-$ или $-OP(O)(OH)O$

где R^d и R^e независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C_{1-32} алкила, C_{2-32} алкенила, C_{3-8} циклоалкила, арила, C_1-C_8 алкиларила, гетероарила, C_1-C_8 алкилгетероарила; и

каждый из $d1-d5$ представляет собой целое число от 0 до 50, $d6$ представляет собой целое число от 1 до 50.

[00035] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная линкерная группа A-D-B-L, упомянутая выше, представляет собой молекулярную цепь, имеющую общее число атомов углерода, атомов азота и атомов кислорода, содержащихся в основной цепи, по меньшей мере 4.

[00036] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанная линкерная группа A-D-B-L, упомянутая выше, представляет собой молекулярную цепь, имеющую общее число атомов углерода, атомов азота и атомов кислорода, содержащихся в основной цепи, от 4 атомов до 600 атомов.

[00037] Согласно еще одному дополнительному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная линкерная группа A-D-B-L представляет собой молекулярную цепь, имеющую длину основной цепи от приблизительно 0,4 нм до приблизительно 400 нм.

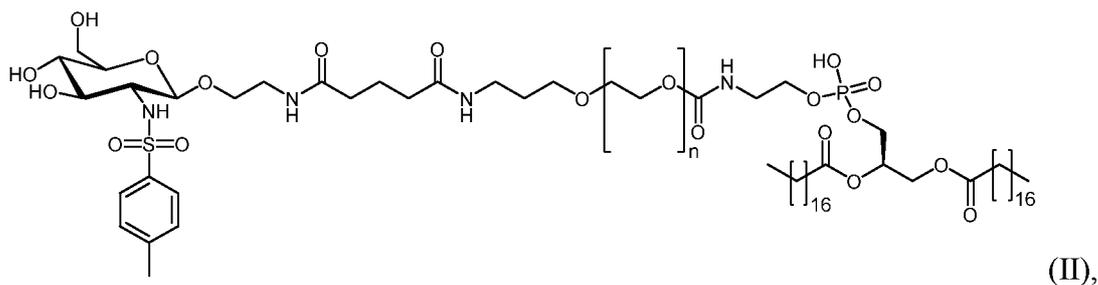
[00038] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное средство для переноса, описанное выше, содержит по меньшей мере один носитель, при этом указанный по меньшей мере один носитель представляет собой мягкую частицу.

[00039] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная мягкая частица выбрана из группы, состоящей из липосомы, ноисомы, мицеллы, секвессомы[™] и трансферосомы, и при этом указанный конъюгат непосредственно связан за счет Z^1 с одной частью указанной мягкой частицы, причем указанная одна часть мягкой частицы представляет собой липид, модифицированный липид, такой как фосфолипид, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE), мембранный липид или модифицированный фосфатидилхолин.

[00040] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения мягкая частица может представлять собой мягкую частицу, такую как липосома, которая содержит один или более типов липидов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат может быть связан с частью мягкой частицы, такой как любые типы липида, которая образует часть липосомы.

[00041] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения липиды, связанные с конъюгатом, и липиды, которые не связаны с конъюгатом, имеют конкретное соотношение приблизительно 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, предпочтительно 1:20.

[00042] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный конъюгат согласно настоящему изобретению, определенный в настоящей заявке выше, связан с одной частью носителя на основе мягкой частицы, что приводит к следующей формуле (II):



в которой n представляет собой целое число от 0 до 150.

[00043] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный по меньшей мере один носитель выбран из группы, состоящей из наночастицы, пептида, белка, токсина, дендримера, фуллерена и углеродной нанотрубки, при этом указанный конъюгат непосредственно связан за счет Z1 с носителем, или при этом указанный конъюгат связан за счет Z1 с дополнительным спейсерным элементом носителя.

[00044] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный дополнительный спейсерный элемент представляет собой природный или синтетический полимер, например, определенный в настоящей заявке выше.

[00045] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная липосома представляет собой двухслойную фосфолипидную липосому. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная липосома имеет размер от 30 до 250 нм.

[00046] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная липосома содержит или ассоциирована с дополнительным компонентом. Особенно предпочтительно указанный дополнительный компонент представляет собой холестерин. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения количество дополнительного компонента, например, холестерина, может варьировать, предпочтительно количество составляет от

приблизительно 20 до 50 мол.%. Более предпочтительно количество указанного дополнительного компонента составляет приблизительно 40 мол.%.

[00047] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная наночастица, упомянутая выше, представляет собой наночастицу золота, серебра или железа. Особенно предпочтительно указанная наночастица имеет размер от 5 до 1000 нм.

[00048] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный носитель содержит груз или ассоциирован с ним.

[00049] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный груз расположен внутри носителя и/или связан с внешней стороной носителя и/или интегрирован в однослойную или двухслойную структуру носителя.

[00050] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное специфичное молекулярное нацеливание, упомянутое выше, включает взаимодействие между указанным конъюгатом и рецептором, присутствующим на лангерин⁺ клетке.

[00051] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный рецептор, присутствующий на дендритной клетке, представляет собой лектиновый рецептор С-типа (CLR) лангерин (CD207).

[00052] Согласно предпочтительному варианту реализации указанное специфичное связывание указанного средства для переноса с дендритной клеткой основано на связывании с лектиновым рецептором С-типа (CLR) лангерином (CD207) со специфичностью, которая по меньшей мере в 2, 4, 8 или 16 раз выше, чем контроль, в клеточном анализе, включающем введение липосом в идентичных условиях в В-клетки Raji, презентующие рекомбинантный лангерин, В-клетки Raji, презентующие рекомбинантный DC-SIGN (контроль 1), и В-клетки Raji дикого типа, не презентующие лектиновый рецептор С-типа (дикий тип, контроль 2).

[00053] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения средний размер средства для переноса составляет от 2 до 1000 нм, измеренный методом динамического рассеяния света (DLS).

[00054] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей по меньшей мере одно средство для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, определенное выше, содержащий или ассоциированный с грузом, определенным в настоящей заявке, и добавку, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку.

[00055] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная добавка представляет собой двухвалентный ион, адъювант или фактор, который стимулирует связывание с лектиновым рецептором С-типа (CLR) лангерином. Особенно предпочтительно указанный двухвалентный ион представляет собой Ca^{2+} или Zn^{2+} .

[00056] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная композиция, упомянутая выше, дополнительно содержит растворитель или комбинацию растворителя с дополнительным соединением. Предпочтительные примеры растворителя представляют собой H_2O , водный раствор сахарозы, фосфатно-солевой буфер, трициновый буфер, буфер HEPES. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения комбинации растворителей с дополнительными соединениями представляют собой любые из упомянутых выше с ДМСО. Согласно одному конкретному варианту реализации концентрация ДМСО составляет 10%.

[00057] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная композиция содержит средство для переноса, определенное выше, в количестве от приблизительно 1 до 10 мол.%, предпочтительно от приблизительно 4 до 6 мол.%, более предпочтительно от 4,75 до 5 мол.%.

[00058] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку, включающему приведение средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, определенного выше, содержащего или ассоциированного с грузом, определенным в настоящей заявке, или композиции, определенной выше, в контакт с лангерин⁺ дендритной клеткой.

[00059] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный груз выбран из группы, состоящей из малой молекулы, пептида, белка, цитотоксического вещества, нуклеиновой кислоты, пигмента, красителя, металла, радионуклида, вируса, модифицированного вируса, вирусного вектора, инокулянта, плазмиды и/или многокомпонентной системы. Многокомпонентная система предпочтительно представляет собой систему для редактирования генома, содержащую различные компоненты. Особенно предпочтительно указанная система редактирования генома представляет собой систему CRISPR/Cas.

[00060] Согласно другому предпочтительному варианту реализации применения или способа, описанных выше, указанный груз представляет собой фармацевтически или иммунологически активное соединение, которое (i) способно вызывать иммунологическую реакцию в организме, (ii) представляет собой иммуномодулятор, (iii)

представляет собой индуктор иммунологической толерантности, или (iv) представляет собой ингибитор клеточной функции, такой как ингибитор апоптоза.

[00061] Согласно другому предпочтительному варианту реализации применения или способа, описанных выше, указанный груз содержит, по существу состоит или состоит из (i) ракового антигена или эпитопа, или содержит раковый антиген или эпитоп, (ii) антигена или эпитопа аутоиммунного заболевания, или содержит антиген или эпитоп аутоиммунного заболевания, (iii) бактериального антигена или содержит бактериальный антиген или эпитоп, (iv) вирусного антигена или содержит вирусный антиген или эпитоп, (v) паразитарного антигена или содержит паразитарный антиген или эпитоп, или (vi) аллергена или эпитопа аллергена, или содержит аллерген или эпитоп аллергена.

[00062] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для переноса, определенное выше, или композицию, определенную выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом и необязательно фармацевтически приемлемым веществом-носителем или фармацевтическим адьювантом.

[00063] Согласно предпочтительному варианту реализации указанная фармацевтическая композиция подходит для перорального, внутривенного, местного, роговичного, назального, подкожного, внутрикожного, трансдермального введения, для вакцинации или для введения через волосяные фолликулы.

[00064] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная фармацевтическая композиция обеспечена в виде пластыря, жидкости, крема, мази, пасты, геля, лосьона, ленты, пленки, подъязычной формы, буккальной формы, таблетки, спрея, суппозитория, вакцины или в форме микроиглы. Особенно предпочтительной формой пластыря является нанопластырь или гидрогелевый пластырь.

[00065] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная фармацевтическая композиция должна быть введена с помощью медицинского устройства, такого как игла, пистолет для вакцинации, пластырь или ингалятор.

[00066] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении или предотвращении рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления, аллергии или для гипосенсибилизации.

[00067] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей средство для переноса, определенное выше, или композицию, упомянутую выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом и необязательно фармацевтически приемлемым веществом-носителем или фармацевтическим адъювантом.

[00068] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная диагностическая композиция предназначена для применения в диагностике, детектировании, мониторинге или прогнозировании рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления или аллергии.

[00069] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу определения подходящей дозы для нацеленной на лангерин⁺ дендритные клетки терапии заболевания, включающему: (a) приведение популяции лангерин⁺ клеток в контакт с соединением, которое может быть введено в клетки, (b) определение количества клеток, которые включили указанное соединение; (c) определение подходящей дозы соединения путем сравнения количества клеток со включенным соединением и исходной популяции, предпочтительно спустя период в 1-3 дня, необязательно путем дополнительной корреляции количества клеток со включенным соединением или их статуса с результатами, известными из литературных источников.

[00070] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к медицинскому набору, содержащему по меньшей мере один элемент, выбранный из средства для переноса, определенного выше, и/или композиции, определенной выше, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, и необязательно листок-вкладыш с инструкциями.

[00071] Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей средство для переноса, определенное выше, или композицию, определенную выше, причем указанный носитель содержит груз инокулянта или ассоциирован с ним.

[00072] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения вакцина предназначена для применения в лечении или предотвращении рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина».

[00073] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против рака, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции у субъекта, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса, определенного выше,

причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, композиции, определенной выше, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, фармацевтической композиции, определенной выше, или вакцины, определенной выше.

[00074] Согласно последнему аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления, аллергии или для гипосенсибилизации, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса, определенного выше, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, композиции, определенной выше, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, фармацевтической композиции, определенной выше, или вакцины, определенной выше.

[00075] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанное введение представляет собой пероральное, роговичное, назальное, внутривенное, местное, подкожное, внутрикожное, трансдермальное введение, вакцинацию или введение через волосяные фолликулы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00076] На Фигуре 1 показана стабильная экспрессия лангерина человека в плазматической мембране клеток Нек293, которую детектировали с помощью CLR-специфичных антител. Изотипическое окрашивание (серый цвет) применяли в качестве отрицательного контроля. Значения интенсивности флуоресценции окрашивания лангерина (темно-серый цвет) сравнивали с фоновой флуоресценцией от клеток дикого типа (светло-серый цвет) и представляли в графической форме в виде гистограммы.

[00077] На Фигуре 2 показана стабильная экспрессия рецептора в плазматической мембране клеток Raji, которую детектировали с помощью CLR-специфичных антител. Изотипическое окрашивание применяли в качестве отрицательного контроля. Значения интенсивности флуоресценции сравнивали с фоновой флуоресценцией от клеток дикого типа и представляли в графической форме в виде гистограммы.

[00078] На Фигуре 3 показана инкапсуляция FITC-БСА и доставка к клеткам, экспрессирующим лангерин. На Фиг. 3 (А) показаны результаты удаления свободного антигена от инкапсулированного антигена с помощью методов гель-проникающей хроматографии и ультрацентрифугирования. Флуоресценцию FITC-БСА измеряли с помощью считывающего устройства для планшетов. Также показаны липосомы с инкапсулированным FITC-БСА, которые применяли в клеточном анализе. Липосомы

инкубировали в течение 2 ч при 37°C, и средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) FITC и Alexa647 измеряли с помощью проточной цитометрии (Фиг. 3 (B)). На Фиг. 3 (C) показано измерение качества липосом с помощью DLS после различных методов очистки. Был проанализирован размер и дзета-потенциал (ZP). На Фиг. 3 (D) показаны липосомы с инкапсулированным FITC, которые инкубировали с лангерин⁺ клетками HeK293 в течение 6 ч при 37°C. Ядро окрашивали DAPI, и клетки анализировали с помощью микроскопии.

[00079] На Фигуре 4 показаны липосомы с инкапсулированным FITC-БСА, которые были очищены с помощью либо гель-проникающей хроматографии, либо ультрацентрифугирования. Затем очищенные липосомы были протестированы в клеточном анализе. 16 мкМ липосом инкубировали с положительными по лангерину человека клетками Raji в течение 2 ч при 37°C. Окрашивание клеток FITC анализировали с помощью проточной цитометрии. Значения MFI корректировали с учетом исходного уровня.

[00080] На Фигуре 5 представлена оптимизация инкапсуляции белка с применением тестового белка FITC-БСА. Для детектирования оптимизированной эффективности инкапсуляции варьировали начальную концентрацию FITC-БСА, которая была использована для повторной гидратации тонкой липидной пленки, как показано на Фиг. 5 (A), и начальную концентрацию липосом в повторно гидратированной липидной пленке, как показано на Фиг. 5 (B). На Фиг. 5 (C) представлен отчет о качестве, включая размер и дзета-потенциал (ZP), которые были проанализированы с помощью DLS. Эффективность инкапсуляции рассчитывали после ультрацентрифугирования с помощью считывающего устройства для планшетов. Инкапсулированный антиген FITC-БСА (AG) рассчитывали на 1 мМ липосом.

[00081] На Фигуре 6 показана дозозависимая интернализация и кинетическая скорость липосом с инкапсулированным FITC-БСА. На Фиг. 6 (A) показана дозозависимая интернализация липосом с инкапсулированным FITC-БСА. Совместно изготовленный липосомальный краситель Alexa647 сравнивали с сигналом флуоресцеина FITC-БСА. На Фиг. 6 (B) показано кинетическое исследование липосом с инкапсулированным FITC-БСА. Совместно изготовленный липосомальный краситель Alexa647 сравнивали с сигналом флуоресцеина FITC-БСА.

[00082] На Фигуре 7 изображена экспрессия и инкапсуляция иммуноактивного белка EBNA и иммунонеактивного контрольного белка PCNA. На Фиг. 7 (A) показана хроматограмма FPLC белков PCNA и EBNA, очищенных с помощью His-метки. На Фиг. 7 (B) показан гель после электрофореза в ДСН-ПААГ очищенных белков PCNA и EBNA, а

также контроля загрузки, контроля проточной фракции и контроля промывки. Размер белка определяли с помощью маркеров массы белков. На Фиг. 7 (С) представлены отчеты о качестве, включая размер и дзета-потенциал (ZP), изготовленных липосом, которые были проанализированы с помощью DLS. Эффективность инкапсуляции рассчитывали после ультрацентрифугирования с помощью считывающего устройства для планшетов. Инкапсулированный антиген (AG) рассчитывали на 1 мМ липосом.

[00083] На Фигуре 8 изображена доставка PCNA и EBNA к LC с помощью липосом, нацеленных на лангерин. Липосомы с инкапсулированным FITC-PCNA и FITC-EBNA инкубировали с суспензиями эпидермальных клеток при 37°C. После инкубации липосом клетки окрашивали по маркерам клеток Лангерганса, включая CD45, HLA-DR, CD1a и лангерин. Кроме того, клетки окрашивали красителем для оценки жизнеспособности eFluor 780 для определения живых/мертвых клеток (L/D). Суспензии эпидермальных клеток анализировали с помощью проточной цитометрии, и клетки Лангерганса оценивали в отношении окрашивания липосом и FITC.

[00084] На Фигуре 9 показана специфичность липосом для лиганда, нацеливающего на лангерин человека, в отношении клеток, экспрессирующих CLR. На Фиг. 9 (А) показано, что для оценки связывания липосом 16 мкМ нефункционализированных и функционализированных липосом инкубировали со стабильно экспрессирующими клетками Raji при 4°C в течение 1 часа. После отмывки клетки непосредственно анализировали с помощью проточной цитометрии. Связывание липосом анализировали с использованием совместно изготовленного красителя Alexa 647. Показаны значения MFI для одного типичного эксперимента, и значения сравнивали с фоновым сигналом с помощью t-критерия (****p<0,0001, n=3). На Фиг. 9 (В) показана конкуренция липосом с 10 мМ ЭДТА или 50 мкг/мл маннана за связывание с лангерин⁺ клетками и DC-SIGN⁺ клетками. Значения MFI для одного типичного примера были представлены в графической форме (***p<0,001, ****p<0,0001, n=3, t-тест, один из двух типичных экспериментов).

[00085] На Фигуре 10 показано изображение интернализации липосом в лангерин⁺ клетки Нек293, полученное с помощью микроскопии. Непокрытые, нацеленные на лангерин и конъюгированные с маннозой липосомы инкубировали с лангерин⁺ клетками Нек293 при 37°C в течение 2 ч. Ядро окрашивали DAPI, а клеточную мембрану окрашивали липофильным красителем DiO. Получали серию срезов по оси Z лангерин⁺ клеток, инкубированных с липосомами, нацеленными на лангерин, и показаны слои клеток с разной фокальной высотой.

[00086] На Фигуре 11 изображена кинетика связывания и интернализации липосом, нацеленных на лангерин. На Фиг. 11 (А) связывание и на Фиг. 11 (В) интернализацию липосом, нацеленных на лангерин, анализировали после разных периодов инкубации при 4°C или 37°C, соответственно. На Фиг. 11 (С) показаны различные концентрации липосом, нацеленных на лангерин, которые инкубировали с лангерин⁺ клетками в течение 24 ч при 37°C.

[00087] На Фигуре 12 показана кинетика интернализации липосом, измеренная с помощью микроскопии. Липосомы, нацеленные на лангерин, инкубировали в течение различных периодов времени с положительными по лангерину человека клетками Нек293 и Нек293 дикого типа. Для детектирования очень чувствительных событий на начальных этапах инкубации и сильных сигналов флуоресценции на поздних этапах инкубации использовали высокое и низкое напряжения ФЭУ для Alexa647.

[00088] На Фигуре 13 изображено нацеливание на клетки Raji, экспрессирующие лангерин человека, с применением GlcN-тозил-функционализованных липосом. Мольное отношение лиганда для нацеливающего лиганда на липосомах варьировали, и 16 мкМ липосом инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клетки анализировали с использованием той же стратегии гейтирования, и сигналы флуоресценции положительных по лангерину человека клеток Raji и клеток Raji дикого типа представляли в графической форме с линейной аппроксимацией в GraphPad Prism.

[00089] На Фигуре 14 показаны кинетики связывания и интернализации липосом, нацеленных на лангерин, содержащих различные мольные соотношения лиганда. На Фиг. 14 (А) связывание и на Фиг. 14 (В) интернализацию липосом, нацеленных на лангерин, анализировали после разных периодов инкубации при 4°C или 37°C, соответственно. На Фиг. 14 (С) показано, что различные концентрации липосом, нацеленных на лангерин, инкубировали с лангерин⁺ клетками в течение 24 ч при 37°C.

[00090] На Фигуре 15 показан путь перемещения липосом в эндосомальные компартменты. На Фиг. 15 (А) клетки Нек293, экспрессирующие лангерин человека, инкубировали с 16 мкМ нацеленных липосом в течение 2 ч при температуре 37°C. После инкубации клетки иммунофлуоресцентно окрашивали по эндосомальным маркерам, включая Rab5, Rab11, EEA1 и Lamp-1. Затем первичные антитела помечали вторичным антителом, конъюгированным с Alexa488. Ядро клетки окрашивали DAPI, и клетки анализировали с помощью микроскопии. На Фиг. 15 (В) показана корреляция между совместной локализацией нацеленных липосом и различных эндосомальных компартментов, выраженная как R-значения Пирсона.

[00091] На Фигуре 16 показана интернализация липосом в эндосомальные компартменты в ранние моменты времени. Клетки COS-7 кратковременно трансфецировали YFP-Rab9. Добавляли нацеленные липосомы и инкубировали в течение различных периодов времени при температуре 37°C. После инкубации клетки фиксировали и иммунофлуоресцентно окрашивали EEA1 с применением первичного антитела к EEA1 (кролик, клон C45B10), а также Rab5 (кролик, клон C8B1) (Cell Signaling Technology) и Rab9 с применением первичного антитела к GFP. Для вторичного окрашивания использовали Alexa488-конъюгированное антитело к белку кролика. Помимо этого ядро клетки окрашивали DAPI.

[00092] На Фигуре 17 представлено исследование цитотоксичности функционализированных липосом в зависимости от времени. На Фиг. 17 (А) в качестве примера показана стратегия гейтирования для необработанных, обработанных ДМСО и обработанных липосомами клеток. Клетки инкубировали в течение 72 ч при температуре 37°C. Клетки, обработанные ДМСО, инкубировали с 50% ДМСО в течение 3 мин после 72-часовой инкубации. Жизнеспособные и мертвые клетки отличали от разрушенных клеток на графике FSC-A/SSC-A. Дублеты различали на графике FSC-A/FSC-H. Затем отдельные клетки анализировали на точечной диаграмме, показывающей окрашивание аннексином-V-FITC по оси абсцисс и 7-AAD по оси ординат, для определения ранних и поздних апоптотических эффектов. Необработанные клетки применяли в качестве отрицательного контроля, а клетки, обработанные ДМСО, представляли собой положительный контроль. На Фиг. 17 (В) повтор исходного элемента (FoP) нескольких временных точек инкубации анализировали для каждого квадранта и наносили на график в виде столбика со сгруппированными колонками. На Фиг. 17 (С) MFI A647 нацеленных и непокрытых липосом, инкубированных с лангерин⁺ клетками, были проанализированы для детектирования интернализации липосом.

[00093] На Фигуре 18 показано исследование дозозависимой цитотоксичности липосом, нацеленных на лангерин. На Фиг. 18 (А) в качестве примера показана стратегия гейтирования для необработанных, обработанных ДМСО и обработанных липосомами клеток. Клетки инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Клетки, обработанные ДМСО, инкубировали с 50% ДМСО в течение 3 мин после 24-часовой инкубации. Жизнеспособные и мертвые клетки отличали от разрушенных клеток на графике FSC-A/SSC-A. Дублеты различали на графике FSC-A/FSC-H. Затем отдельные клетки анализировали на точечной диаграмме, показывающей окрашивание аннексином-V-FITC по оси абсцисс и 7-AAD по оси ординат, для определения ранних и поздних апоптотических эффектов. Необработанные клетки применяли в качестве отрицательного

контроля, а клетки, обработанные ДМСО, представляли собой положительный контроль. На Фиг. 18 (В) были проанализированы несколько концентраций липосом до 1 мМ. Повтор исходного элемента (FoP) определяли для каждого квадранта и наносили на график в виде столбика со сгруппированными колонками. На Фиг. 18 (С) MFI A647 нацеленных и непокрытых липосом, инкубированных с лангерин⁺ клетками, были проанализированы для детектирования интернализации липосом.

[00094] На Фигуре 19 показана активность липосом в отношении соответствующих полиморфизмов лангерина. На Фиг. 19 (А) было протестировано связывание непокрытых и нацеленных липосом с клетками Raji дикого типа, клетками Raji, экспрессирующими лангерин человека⁺ дикого типа, мутант N288D, мутант K313I или двойной мутант N288D/K313I. 16 мкМ липосом инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Связывание анализировали на основании MFI совместно изготовленного красителя A647. Данные были нормированы к лангерин⁺ клеткам дикого типа (**p<0,001, ****p<0,0001, n=3, t-критерий, один из двух типичных экспериментов). На Фиг. 19 (В) экспрессирующие клетки Raji тестировали для определения экспрессии ими внеклеточных рецепторов с применением ФЭ-конъюгированного антитела к лангерину человека (клон DCGM4). MFI нормировали к экспрессии лангерина дикого типа (**p<0,01, ***p<0,001, n=3, t-тест, один из двух типичных экспериментов). На Фиг. 19 (С) относительное связывание липосом представляли в графической форме путем вычисления кратности связывания липосом (А) по отношению к окрашиванию антителом (В) (**p<0,001, ****p<0,0001, n=3, t-тест; #Данные клеток Raji дикого типа были исключены, один из двух типичных экспериментов). На Фиг. 19 (D), в дополнение к связыванию липосом, интернализацию липосом отслеживали в течение 24 ч при 37°C. MFI совместно изготовленного красителя A647 непосредственно представляли в графической форме.

[00095] На Фигуре 20 показана количественная оценка GFP, нагруженного нацеливающим лигандом, с помощью MALDI-TOF.

[00096] На Фигуре 21 показано связывание и интернализация конъюгированных белков в сравнении с липосомами с инкапсулированным FITC-БСА. На Фиг. 21 (А) связывание и поглощение функционализированного GFP при 4°C и 37°C в зависимости от дозы измеряли с помощью проточной цитометрии с применением клеток Raji и лангерин⁺ Raji. На Фиг. 21 (В) GFP и липосомы инкубировали в течение различных периодов времени с лангерин⁺ клетками Raji. В данном случае липосомы с инкапсулированным FITC-БСА применяли для сравнения флуоресценции FITC с флуоресценцией GFP.

[00097] На Фигуре 22 изображена конкуренция за связывание с маннаном. На Фиг. 22 (А) показана конкуренция за связывание функционализированных лигандом липосом

или GFP с маннаном. Носители лиганда инкубировали с лангерин⁺ клетками Raji в течение 4 ч при температуре 37°C. Маннан добавляли непосредственно при 37°C для конкуренции за связывание и интернализацию или добавляли после 4-часового этапа инкубации (после промывки при 4°C) для удаления внеклеточных связанных носителей. (Один типичный эксперимент из трех, n=3). На Фиг. 22 (B) функционализированные липосомы или GFP инкубировали с лангерин⁺ клетками Raji в течение 30 мин при 37°C. После промывки добавляли маннан или DPBS (с Ca²⁺/Mg²⁺) в течение различных периодов времени. (Один типичный эксперимент из четырех, n=3).

[00098] На Фигуре 23 представлен анализ методом проточной цитометрии гранул ПММА, нагруженных нацеливающим лигандом, который показывает специфичное связывание с клетками ТНР-1, экспрессирующими лангерин человека.

[00099] На Фигуре 24 показано нацеливание на первичные клетки Лангерганса в суспензиях эпидермальных клеток. На Фиг. 24 (A) суспензии эпидермальных клеток получали из образцов кожи человека. Клетки затем инкубировали с липосомами в концентрации 16 мкМ в течение 1 ч при 37°C. В качестве контроля к клеточным средам добавляли 10 мМ ЭДТА. После инкубации липосом клетки окрашивали по маркерам клеток Лангерганса, включая CD45, HLA-DR, CD1a и лангерин. Кроме того, клетки окрашивали красителем для оценки жизнеспособности eFluor 780 для определения живых/мертвых клеток (L/D). Суспензии эпидермальных клеток анализировали с помощью проточной цитометрии, и оценивали окрашивание липосом в клетках Лангерганса. Фиг. 24 (B): на основании стратегии гейтирования (A) MFI непокрытых и нацеленных липосом анализировали для различных подгрупп клеток, включая CD45⁻; CD1a⁻; HLR-DR⁻; и CD1a⁺, HLR-DR⁺-экспрессирующие клетки. Фиг. 24 (C): для анализа интернализации липосом ЭДТА добавляли после или во время этапа инкубации. ЭДТА, добавленный после инкубации, удаляет внеклеточно связанные липосомы и, следовательно, отражает интернализацию липосом. В то время как ЭДТА, добавленный во время этапа инкубации, предотвращает связывание липосом и служит в качестве контроля. Для того чтобы предотвратить интернализацию рецепторов, клетки инкубировали при 4°C. На Фигуре 24 (D) суспензии эпидермальных клеток окрашивали FITC-конъюгированным антителом к CD1a и инкубировали с нацеленными липосомами в течение 1 ч при 37°C. Впоследствии клетки анализировали с помощью микроскопии.

[000100] На Фигуре 25 показана специфичность липосом в отношении клеток Лангерганса за счет лиганда, нацеленного на лангерин. Суспензии клеток цельной кожи получали из образцов кожи человека. Клетки кожи затем инкубировали с липосомами в концентрации 16 мкМ в течение 1 ч при 37°C. После инкубации липосом клетки

окрашивали по маркерам клеток Лангерганса, включая CD45, HLA-DR, CD1a и лангерин. Кроме того, клетки окрашивали красителем для оценки жизнеспособности eFluor 780 для определения живых/мертвых клеток (L/D) и антителом к CD14 для окрашивания моноцитов и макрофагов. Суспензии клеток цельной кожи анализировали с помощью проточной цитометрии, и оценивали окрашивание липосом в различных подгруппах клеток.

[000101] На Фигуре 26 схематически изображена молекула, в которой хвостовая область (гидрофобная часть) конъюгата встроена в структуру липидного бислоя, в то время как головная область расположена вне носителя и, таким образом, способна взаимодействовать с рецепторами.

[000102] На Фигуре 27 показан дизайн гликомиметического нацеливающего лиганда для лангерина человека, основанный на принципе гепарина. На Фиг. 27 (A) происходящий из гепарина моносахарид GlcNS был идентифицирован как благоприятный каркас для дизайна гликомиметического лиганда. Дизайн аналогов GlcNS наталкивает на открытие гликомиметического нацеливающего лиганда **15**. **15** несет этиламинный линкер в β -ориентации C1 для конъюгации с платформой для доставки. **20** применяли в качестве эталонной молекулы на основе маннозы (Man) на всем протяжении исследования. Фиг. 27 (B): на основании способа связывания GlcNAc (код PDB: 4N32) было выдвинуто предположение, что небольшие ароматические заместители в C2 повышают аффинность за счет образования катион- π -взаимодействий с K299 и K313 или π - π и H- π взаимодействий с F315 и R310. Рецепторная поверхность контрастирована в соответствии с ее липофильностью (липофильная: темно-серая, гидрофильная: светло-серая). Фиг. 27 (C): эксперименты с помощью ^{19}F -ЯМР с фильтрованием по R2 выявили 42-кратное повышение аффинности для модельного лиганда **16** ($K_i=0,24\pm 0,03$ мМ) по сравнению с эталонной молекулой на основе маннозы **21** ($K_i=10\pm 1$ мМ). Помимо этого **16** продемонстрировал перспективную специфичность в отношении DC-SIGN ($K_{i,\text{DC-SIGN}}=15\pm 3$ мМ). Фиг. 27 (D): аффинность **16** в отношении лангерина была подтверждена в экспериментах с помощью ^{15}N HSQC ЯМР (гетероядерной ЯМР-спектроскопии с одноквантовым переносом когеренции), в которых анализировали резонансы в режимах быстрого обмена ($K_{D,\text{fast}}=0,23\pm 0,07$ мМ) и медленного обмена ($K_{D,\text{slow}}=0,3\pm 0,1$ мМ).

[000103] На Фигуре 28 показан анализ способа связывания гликомиметического нацеливающего лиганда. Фиг. 28 (A) и (B): эксперименты с помощью ^{15}N HSQC ЯМР выявили профиль возмущения химического сдвига (CSP) для **16**. При титровании наблюдали резонансы в режиме быстрого обмена, такие как I250 и E285, а также резонансы в режиме медленного обмена, включая Y251. Фиг. 28 (C): картирование CSP на

рентгеновской структуре лангерина в комплексе с GlcNAc (код PDB: 4N32) подтвердило Ca^{2+} -зависимый способ связывания, о котором свидетельствуют CSP, наблюдаемые для E285 и K299. По сравнению с титрованиями с применением **21**, Y251, I250 и T314 демонстрировали относительное повышение CSP, в то время как для K313 наблюдали уменьшение. В целом, большинство остатков, демонстрирующих повышенные CSP, могут быть ассоциированы с N307 и F315, которые не могут быть соотнесены. Фиг. 28 (D): эксперименты с помощью разностной ЯМР-спектроскопии на переносе насыщения (STD ЯМР) применяли для дальнейшего подтверждения взаимодействия между **16** и лангериним. Спектры STD ЯМР записывали при времени насыщения t_{sat} 0,4 с и увеличивали в 8 раз. Эпитопы, определенные по кривым роста, указывают на сильные взаимодействия, образованные фенильным заместителем. Напротив, низкие относительные значения STD'_0 наблюдали для ацетилированного этиламинного линкера, что согласуется с ориентацией, доступной для растворителя. Фиг. 28 (E): **16** был присоединен в сайт связывания углеводов, чтобы обосновать наблюдения в экспериментах с помощью ^{15}N HSQC и STD ЯМР. Отобранное положение присоединения позволяло прогнозировать образование π - π взаимодействий между фенильным кольцом и F315, а также образование водородной связи между сульфонамидной группой и N307. Линкер демонстрирует высокую доступность для растворителя. Рецепторная поверхность контрастирована в соответствии с ее липофильностью (липофильная: темно-серая, гидрофильная: светло-серая).

[000104] На Фигуре 29 показана взаимосвязь структура-активность и специфичность отобранных соединений в отношении DC-SIGN.

[000105] На Фигуре 30 показано определение K_i для сульфатированных производных GlcNAc. Определение K_i для производных GlcNAc, происходящих из гепарина, с помощью ^{19}F -ЯМР с фильтрованием по R2 выявило влияние профилей сульфатирования на аффинность моносахарида. Полученные значения K_i представлены на Фигуре 39.

[000106] На Фигуре 31 показано определение K_i для аналогов GlcNS **1-5**. Эксперименты по конкурентному связыванию применяли для определения значений аффинности для библиотеки аналогов GlcNS. Полученные значения K_i приведены на Фигуре 39.

[000107] На Фигуре 32 показано определение K_D для маннозного аналога **21**. Фиг. 32 (A) и (B): эксперименты с помощью ^{15}N HSQC ЯМР применяли для подтверждения полученного значения K_i для **2**. Соотнесенные резонансы, детектированные в эталонном спектре, выделены (серый цвет). Фиг. 32 (C): соотнесенные резонансы, демонстрирующие

быстрый химический обмен и CSP более 0,06 м.д., были отобраны для определения значений K_D . Полученное значение K_D показано на Фигуре 29.

[000108] На Фигуре 33 показано определение K_D для аналога GlcNS **2**. Фиг. 33 (A) и (B): эксперименты с помощью ^{15}N HSQC ЯМР применяли для подтверждения полученного значения K_i для **2**. Соотнесенные резонансы, детектированные в эталонном спектре, выделены (серый цвет). Фиг. 33 (C): для определения значений K_D были отобраны соотнесенные резонансы, демонстрирующие быстрый химический обмен и CSP более 0,04 м.д. Фиг. 33 (D): помимо этого набор остатков, включая K299 и T314, также продемонстрировал явления медленного обмена. Для этих остатков интегралы V_f и V_b резонансов, соответствующих свободному и связанному состояниям лангерина, применяли для определения значений K_D . Полученные значения K_D представлены на Фигуре 29.

[000109] На Фигуре 34 показан анализ способа связывания с помощью ^{15}N HSQC ЯМР для аналогов GlcNS **2**, **16** и маннозного аналога **21**. Фиг. 34 (A)-(C): картирование значений CSP на рентгеновской структуре лангерина (код PDB: 4N32 или 35PF) подтвердило Ca^{2+} -зависимый способ связывания для **2** и **16**, о котором свидетельствовали CSP, наблюдаемые для E285 и K2999,10. Помимо этого CSP наблюдали для остатков N297, A300 и S302, также затронутых при распознавании маннозы или **21**. Напротив, Y251 и I250 продемонстрировали значительно повышенные значения CSP по сравнению с **21**, в то время как для K313 наблюдали относительное уменьшение. Это уменьшение сопровождалось относительным повышением для проксимального T314. Примечательно, что остатки, которые демонстрируют значительно повышенные значения CSP, могут преимущественно ассоциироваться с F315 и N307, которые не были соотнесены. Это также верно для W252 и W306, которые продемонстрировали меньшее относительное повышение. Соответственно, наблюдаемый профиль CSP может быть индуцирован взаимодействиями между **2** или **16** и F315, но не K313. Сходно с маннозой и **21**, CSP также наблюдали в удаленных областях складки домена, подобного лектину С-типа, в частности, для K257 и G259 в области короткой петли. Это может указывать на модуляцию ранее описанной аллостерической сети. Фиг. 33 (D): сравнение титрований с применением **16** и **21** выявило различные траектории CSP для остатков, ассоциированных с сайтом связывания углеводов, таких как E285 или W252, в то время как траектории остатков, расположенных в удаленных областях складки, подобной лектину С-типа, например, K257, были консервативными.

[000110] На Фигуре 35 показаны кривые роста STD ЯМР для аналога GlcNS **16**. Уравнение 5 аппроксимировали к значениям STD, чтобы вычислить значения STD'₀ для определения связывающего эпитопа **16**.

[000111] На Фигуре 36 показано картирование эпитопа для маннозного аналога **21** с помощью STD ЯМР. Фиг. 36 (А): эксперименты с помощью STD ЯМР применяли для изучения взаимодействия **21** с лангерином. Спектры STD ЯМР записывали при времени насыщения t_{sat} 0,4 с и увеличивали в 8 раз. Фиг. 36 (В): эпитоп для **21** был определен на основании кривых роста, и это позволяет предположить доступную для растворителя ориентацию ацетилированного этиламинного линкера (см. также Фигуру 37).

[000112] На Фигуре 37 показаны кривые роста STD ЯМР для маннозного аналога **21**. Уравнение 5 аппроксимировали к значениям STD, чтобы вычислить значения STD'₀ для определения связывающего эпитопа **21**.

[000113] На Фигуре 38 показано молекулярное присоединение для аналога GlcNS **16**. Фиг. 38 (А): было установлено, что модель фармакофоров определяет начальное размещение **16** в сайте связывания углеводов лангерина (код PDB: 4N32) и ограничивает ориентацию каркаса Glc во время уточнения положений присоединения на основе силового поля. Все продемонстрированные отличительные особенности требуют наличия атома кислорода в указанных сферах. Фиг. 38 (В): четыре из десяти полученных положений присоединения напоминают изображенную конформацию **16**. Отобранное положение присоединения позволяло прогнозировать образование π - π взаимодействий между фенильным кольцом и F315, а также образование водородной связи между сульфонамидной группой и N307. Ацетилированный этиламинный линкер демонстрирует высокую степень доступности для растворителя. Соответственно, это положение присоединения согласуется с экспериментами как с помощью ¹⁵N HSQC, так и STD ЯМР. Фиг. 38 (С): изображенная альтернативная конформация **16** является типичной для трех из десяти полученных положений присоединения. Отобранное положение присоединения позволяет прогнозировать образование катион- π -взаимодействия между фенильным кольцом и K313, а также образование водородной связи между сульфонамидом и E293. Ацетилированный этиламинный линкер демонстрирует высокую степень доступности для растворителя. Однако это положение присоединения в меньшей степени согласовывалось с результатами ¹⁵N HSQC ЯМР, в частности, относительным уменьшением значений CSP для K313. Исследование молекулярного присоединения выявило три дополнительных уникальных положения присоединения для **16**, которые были исключены из-за неблагоприятных двугранных углов для сульфонамидного линкера. Рецепторная

поверхность контрастирована в соответствии с ее липофильностью (липофильная: темно-серая, гидрофильная: светло-серая).

[000114] На Фигуре 39 показана взаимосвязь структура-активность ряда нацеливающих лигандов, аналогов GlcN в положении 2' и сульфатированных моносахаридов.

Страница намеренно оставлена пустой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ

[000115] Несмотря на то, что настоящее изобретение будет описано в отношении конкретных вариантов реализации, это описание не следует истолковывать как ограничивающее. Ниже приведены определения, которые важны для понимания настоящего изобретения.

[000116] В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа (соотв. «а» и «an» в исходном тексте на английском языке) также включают множественное число соответствующих объектов, если из контекста явно не следует иное.

[000117] Применительно к настоящему изобретению термины «примерно» и «приблизительно» обозначают интервал точности, который поймет квалифицированный специалист в данной области техники, чтобы тем не менее обеспечить технический эффект рассматриваемого признака. Термин, как правило, указывает на отклонение от указанного числового значения $\pm 20\%$, предпочтительно $\pm 15\%$, более предпочтительно $\pm 10\%$ и даже более предпочтительно $\pm 5\%$.

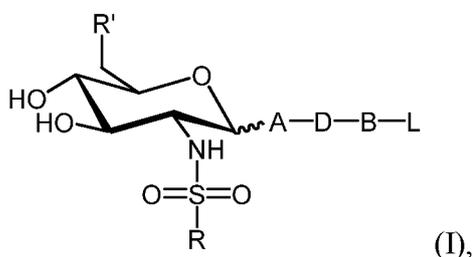
[000118] Следует понимать, что термин «содержащий» не является ограничивающим. Для целей настоящего изобретения термин «состоящий из» или «по существу состоящий из» считается предпочтительным вариантом термина «содержащий». Если в дальнейшем определено, что группа включает по меньшей мере определенное количество вариантов реализации, это означает, что также включена группа, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов реализации.

[000119] Кроме того, термины «(i)», «(ii)», «(iii)» или «(a)», «(b)», «(c)», «(d)», или «первый», «второй», «третий» и т. п. в описании или формуле изобретения используются для разграничения сходных элементов и не обязательно для описания последовательного или хронологического порядка. Следует понимать, что используемые таким образом термины являются взаимозаменяемыми при соответствующих обстоятельствах и что варианты реализации настоящего изобретения, описанные в настоящей заявке, могут быть функциональными в других последовательностях, чем описанные или проиллюстрированные в настоящей заявке. В случае если термины относятся к этапам способа или применения, между этапами отсутствует согласованность по времени или временному интервалу, т. е. этапы можно осуществлять одновременно или между такими этапами могут быть временные интервалы в секунды, минуты, часы, дни, недели и т. д., если не указано иное.

[000120] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, реагентами и т. д., описанными в настоящей

заявке, поскольку они могут варьировать. Также следует понимать, что в настоящей заявке терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не определено иное, все технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в данной области техники.

[000121] Как было изложено выше, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к применению средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, причем указанное средство для переноса способно специфично связываться с лангерин⁺ клеткой, при этом указанное средство для переноса содержит (а) по меньшей мере один носитель и (b) по меньшей мере один конъюгат общей формулы (I)



в которой

(i) R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила;

при этом указанные заместители независимо выбраны из группы, состоящей из -N(R^a)(R^b), -OR^a, -SR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)(R^b), -N(R^a)C(O)R^b, -N(R^a)S(O)₂R^b, -OS(O)₂R^a, галогена, -NO₂, -CN, -NC, -N₃, -NCO, -OCN, -NCS, -SCN, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, арила и гетероарила;

где R^a и R^b независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₈ алкила, C₂₋₈ алкенила, C₂₋₈ алкинила, C₃₋₆ циклоалкила, арил-C₁₋₅ алкила, гетероарил-C₁₋₅ алкила, арила, гетероарила;

(ii) R' независимо выбран из группы, состоящей из -OR^a и -NHS(O)₂R^a,

где R^a определен выше; и в которой

(iii) A-D-B-L представляет собой линкерную группу, ковалентно связывающую производное глюкозы формулы (I) с носителем или с частью носителя, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку.

[000122] Применение средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, описанного в настоящей заявке, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку может представлять собой как применение *in vivo*, например, в терапевтических или диагностических ситуациях, так и применение *in vitro* или *ex vivo*.

[000123] В настоящей заявке термин «конъюгат» относится к комбинации производного глюкозы, указанного в формуле (I), которое действует как лиганд для лангерина, и линкерной группы, имеющей вид A-D-B-L, в которой элементы A, D и B относятся или имеют функциональную активность спейсера, как будет более подробно описано ниже, и в которой элемент L относится к линкерному элементу, что также будет более подробно объяснено в настоящей заявке ниже.

[000124] Соответственно, «конъюгат» согласно настоящему изобретению представляет собой часть «средства для переноса», содержащую производное глюкозы формулы (I)-лиганд, линкерную группу A-B-D-L и носитель, причем указанный носитель способен переносить или транспортировать груз.

[000125] В настоящей заявке термин «лиганд» относится к молекуле, пептиду или белку, который связывается с рецепторным белком, который изменяет химическую конформацию, влияя на ориентацию его трехмерной формы. Связывание происходит за счет межмолекулярных сил, таких как ионные связи, водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса. Лиганд, содержащийся в средстве для переноса согласно настоящему изобретению, представляет собой лиганд для лангерина, также называемый «производное глюкозы», при этом «лангерин» представляет собой гомотримерный трансмембранный рецептор II типа и подтип лектиновых рецепторов С-типа, расположенных на поверхности клеток Лангерганса, который также может называться «CD207». В настоящей заявке последовательность лангерина представлена вариантом дикого типа с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2. В настоящем изобретении также предусмотрены их гомологичные варианты, например, варианты аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, имеющие 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% гомологию с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2. Также предусмотрены природные SNP-формы лангерина, например, SNP-форма V278A (rs741326, база данных SNP Национального центра биотехнологической информации (NCBI)) с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 3, кодируемой нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4. Лангерин, содержащий V278A SNP,

имеет распространенность 49,9% и показал связывание с сахаром, аналогичное таковому для A278 (Ward et al., 2006. J Biol Chem, 281: 15450-6). Дополнительную информацию можно получить из базы данных SNP NCBI или подходящего литературного источника, такого как Feinberg et al., 2013, J. Biol Chem. 27, 288, 52, 36762-71. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены их гомологичные варианты, например, варианты аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, имеющие 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% гомологию с последовательностью SEQ ID NO: 3 или 4. Также предусмотрены дополнительные варианты SNP, такие как N288D (rs13383830, база данных SNP NCBI) с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 5, кодируемой нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6; K313I (rs57302492, база данных SNP NCBI) с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 7, кодируемой нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8; и N288D/K313I с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 9, кодируемой нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены их гомологичные варианты, например, варианты аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, имеющие 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% гомологию с последовательностью любой из SEQ ID NO: 5-10. Также предусмотрены оптимизированные по кодонам варианты лангерина. Эти варианты могут быть адаптированы к предусмотренной ситуации экспрессии, например, оптимизация кодонов может быть предусмотрена для бактериальных штаммов, например, штаммов *E. coli*, для клеток млекопитающих и т. д., как будет известно квалифицированному специалисту. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения последовательность с оптимизированными кодонами для лангерина, содержащая StreptagII и сайт TEV на С-конце, которая может применяться для экспрессии в *E. coli*, представлена нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 29.

[000126] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения «лангерин» также может представлять собой молекулу, происходящую из млекопитающих, отличных от человека, например, мышей, обезьян, коров, свиней и т. д. В конкретном варианте реализации согласно настоящему изобретению, таким образом, предусмотрено применение варианта мышинового лангерина с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 13, кодируемой нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14. Согласно

настоящему изобретению также предусмотрены их гомологичные варианты, например, варианты аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, имеющие 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% гомологию с последовательностью SEQ ID NO: 13 или 14.

[000127] Таким образом, при ссылке на «лангерин⁺» предусмотрено наличие рецептора лангерина, определенного в настоящей заявке выше. В настоящей заявке термин «лангерин⁺ клетка» относится к клетке, предпочтительно дендритной клетке (ДК), например, клетке Лангерганса, которая экспонирует на своей поверхности специфический CLR лангерин. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения клетка также может представлять собой клетку другого происхождения.

[000128] Было обнаружено, что взаимодействия гликан-лангерин, определенные выше, преимущественно ограничиваются одним моносахаридом и во многом определяются координацией иона Ca^{2+} двумя соседними экваториальными гидроксильными группами. Эти гидроксильные группы являются частью протяженной сети водородных связей, образованной между моносахаридом, ионом Ca^{2+} и остатками рецептора, включая E285, E293, N297 и N307. Более того, было обнаружено, что экваториальная ацетамидная группа N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) взаимодействует с K299 за счет структурной молекулы H_2O и слабого гидрофобного контакта метильной группы с P310. Более того, был проведен подробный анализ аналогов глюкозамин-2-сульфата (GlcNS) с помощью SAR, который свидетельствует о том, что введение фенильного кольца приводит к ароматическим взаимодействиям с K299, P310 или F315, что приводит к повышению аффинности. Дальнейшие подходы к дизайну показали благоприятные взаимодействия, подробно описанные в настоящей заявке в разделе «Примеры». Введение линкера в C1 каркаса Glc за счет образования бета-глюкозида обеспечивало эффективные нацеливающие лиганды. Исходя из этих результатов, средство для переноса может содержать GlcNS-структуру, содержащую линкерную структуру в положении C1, несколько заместителей сульфата в положении C2, экваториальные гидроксильные группы в положениях C3 и C4, а также гидроксильную группу или сульфоновую кислоту, или уоновую кислоту в положении C6 GlcNS. Также предусмотрены дополнительные функциональные группы.

[000129] В настоящей заявке термин «специфичное молекулярное нацеливание» включает взаимодействие между лигандом, определенным в настоящей заявке выше, являющимся частью конъюгата, определенного в настоящей заявке, и рецептором лангерином, присутствующим на лангерин⁺ клетке, как определено в настоящей заявке. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения специфичное

молекулярное нацеливание включает взаимодействие между лигандом, определенным в настоящей заявке выше, являющимся частью средства для переноса, определенного в настоящей заявке, и рецептором лангерином, присутствующим на лангерин⁺ клетке, как определено в настоящей заявке. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения специфичное молекулярное нацеливание включает взаимодействие между указанным конъюгатом или средством для переноса и рецептором, присутствующим на лангерин⁺ клетке.

[000130] В настоящей заявке термин «средство для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки», таким образом, относится к средству для переноса, которое способно к специфичному молекулярному нацеливанию на лангерин⁺ клетки.

[000131] Это специфичное нацеливание, упомянутое выше, представляет собой специфичное связывание средства для переноса, определенного в настоящей заявке, с дендритной клеткой, в частности, с экспрессирующей лангерин дендритной клеткой. Специфичное связывание происходит между средством для переноса, а именно лигандной частью средства для переноса, и рецептором лангерином на поверхности клетки. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения это связывание проявляет специфичность, которая по меньшей мере в 2 раза выше, чем контроль, в клеточном анализе, включающем введение липосом в идентичных условиях в В-клетки Raji, презентирующие рекомбинантный лангерин, В-клетки Raji, презентирующие рекомбинантный DC-SIGN (контроль 1), и В-клетки Raji дикого типа, не презентирующие лектиновый рецептор С-типа (дикий тип, контроль 2). В других более предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения специфичность в 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- или 12 раз выше, чем контроль, в клеточном анализе, включающем введение липосом в идентичных условиях в В-клетки Raji, презентирующие рекомбинантный лангерин, В-клетки Raji, презентирующие рекомбинантный DC-SIGN (контроль 1), и В-клетки Raji дикого типа, не презентирующие лектиновый рецептор С-типа (дикий тип, контроль 2). Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения специфичность в 16 раз выше, чем контроль, в клеточном анализе, включающем введение липосом в идентичных условиях в В-клетки Raji, презентирующие рекомбинантный лангерин, В-клетки Raji, презентирующие рекомбинантный DC-SIGN (контроль 1), и В-клетки Raji дикого типа, не презентирующие лектиновый рецептор С-типа (дикий тип, контроль 2). Термин «DC-SIGN» относится к другому рецептору, экспрессируемому дендритными клетками, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность

SEQ ID NO: 12. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены их гомологичные варианты, например, варианты аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, имеющие 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% гомологию с последовательностью SEQ ID NO: 11 или 12. Также предусмотрены варианты DC-SIGN с оптимизированными кодонами. Эти варианты могут быть адаптированы к предусмотренной ситуации экспрессии, например, оптимизация кодонов может быть предусмотрена для бактериальных штаммов, например, штаммов *E. coli*, для клеток млекопитающих и т. д., как будет известно квалифицированному специалисту. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения последовательность с оптимизированными кодонами для DC-SIGN, содержащая StreptagII и сайт TEV на С-конце, которую можно применять для экспрессии в *E. coli*, представлена нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 52. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения «DC-SIGN» также может представлять собой молекулу, происходящую из млекопитающих, отличных от человека, например, мышей, обезьян, коров, свиней и т. д.

[000132] Анализ, который должен быть выполнен для определения специфичности, как упомянуто выше, предпочтительно включает этапы, упомянутые в примере 10.

[000133] Применительно к настоящему изобретению можно применять другой родственный лангерину белок, например, для формата анализа, описанного для DC-SIGN (см. выше). Предпочтительный пример такого родственного лангерину белка представляет собой дектин. Особенно предпочтительно дектин представляет собой вариант мышинового дектина или mDectin. Термин «mDectin» относится к члену А семейства 7 лектиновых доменов С-типа, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены их гомологичные варианты, например, варианты аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, имеющие 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% гомологию с последовательностью SEQ ID NO: 15 или 16. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения «дектин» также может представлять собой молекулу, происходящую от человека или других млекопитающих, отличных от человека, например, обезьян, коров, свиней и т. д.

[000134] В настоящей заявке термин «нацеленная доставка груза» относится к транспортировке груза, например, определенного в настоящей заявке ниже, к клетке-мишени, например, лангерин⁺ клетке, определенной в настоящей заявке, предпочтительно

клетке, экспонирующей лангерин на своей поверхности. Транспортировка может включать введение груза в клетку или может включать выгрузку груза вблизи, например, у поверхности клетки. Доставка груза может в любом случае включать взаимодействие лиганда, определенного в настоящей заявке, с его когнатным рецептором, т. е. лангерином, как упомянуто в настоящей заявке. Доставка груза может зависеть и/или корректироваться в соответствии с применяемым носителем, в частности, носителем, определенным в настоящей заявке ниже. Определенные носители могут потребовать введения груза в клетку, в то время как другие носители можно применять для выгрузки груза у поверхности клетки или вблизи клетки. Термин «доставка» может включать процесс выгрузки груза, но также может включать связь носителя и груза даже после того, как лиганд связался со своей мишенью, т. е. с лангерином. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения доставка может включать высвобождение носителя в раннем эндосомальном компартменте или позднем эндосомальном компартменте или лизосоме для дальнейшего процессинга груза. Это высвобождение может быть инициировано, например, подкислением эндосомального компартмента, обогащением или истощением кофакторов взаимодействия рецептор/лиганд, таких как Ca^{2+} , ферментативным расщеплением рецептора, нацеливающего лиганда или носителя. Также предусмотрено фотоиндуцированное высвобождение лекарственного средства, которое может происходить, например, из термочувствительных AuNP-липосом с использованием AuNP-переключателя. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения доставка может быть основана на термочувствительных липосомах или термореактивных магнитных липосомах. Эти липосомы могут быть сконструированы, например, чтобы сочетать признаки магнитного нацеливания и термореактивного контролируемого высвобождения для инициируемой гипертермией локальной доставки лекарственного средства. Более подробная информация может быть получена, например, из Dai et al., 2017, *J Microencapsul.* 34(4): 408-415 или из Kneidl et al., 2014, *Int J Nanomedicine*, 9: 4387–4398.

[000135] В настоящей заявке термин «алкил» относится к углеводородной группе с линейной или разветвленной цепью. Углеводород, имеющий указанное число атомов углерода (например, «C₁-C₈» алкил относится к алкильной группе, имеющей от 1 до 8 атомов углерода). Если число атомов углерода не указано, алкильная группа имеет от 1 до 100 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, трет-бутил и н-пентил. Алкильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями.

[000136] Термин «алкенил» относится к ненасыщенной углеводородной цепи, которая может представлять собой линейную цепь или разветвленную цепь, содержащую от 2 до 100 атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод. Алкенильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями.

[000137] Термин «алкинил» относится к ненасыщенной углеводородной цепи, которая может представлять собой линейную цепь или разветвленную цепь, содержащую от 2 до 100 атомов углерода и по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод. Алкинильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями.

[000138] «Замещенная» группа относится к любому замещению любого профиля этой группы. Эта группа необязательно может быть замещена одним или более заместителями, причем указанные заместители могут быть как одного и того же типа, так и разных типов. Заместители могут быть выбраны из группы, включающей $-N(R^a)(R^b)$, $-OR^a$, $-SR^a$, $-C(O)R^a$, $-C(O)OR^a$, $-C(O)N(R^a)(R^b)$, $-N(R^a)C(O)R^b$, $-N(R^a)S(O)_2R^b$, $-OS(O)_2R^a$, галоген, $-NO_2$, $-CN$, $-NC$, $-N_3$, $-NCO$, $-OCN$, $-NCS$, $-SCN$, замещенный или незамещенный алкил, алкенил, алкинил, арил и гетероарил. В то время как термин «незамещенная» группа относится к группе, которая представляет собой углеводородную группу.

[000139] В настоящей заявке термин «галоген», «гал» или «гало» означает F, Cl, Br или I.

[000140] В настоящей заявке термин «арилалкил» относится к насыщенной или ненасыщенной углеводородной цепи, которая может представлять собой линейную цепь или разветвленную цепь, содержащую от 1 до 100 атомов углерода, и которая может содержать тройную связь углерод-углерод и/или sp^2 -гибридизованные атомы углерода двойных связей. Арильные и/или алкильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями. Sp^2 или sp атомы углерода алкенильной группы и алкинильной группы, соответственно, необязательно могут быть местом присоединения алкенильной или алкинильной групп.

[000141] Термин «циклоалкил» относится к углеводородной 3-8-членной моноциклической или 7-14-членной бициклической кольцевой системе или более крупной кольцевой системе более чем из 15 кольцевых членов, имеющей по меньшей мере одно насыщенное кольцо или имеющей по меньшей мере одно неароматическое кольцо, причем указанное неароматическое кольцо может иметь некоторую степень ненасыщенности. Циклоалкильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого кольца циклоалкильной группы могут быть замещены заместителем. Типичные примеры циклоалкильной группы включают циклопропил, циклопентил, циклогексил, циклобутил, циклогептил, циклопентенил, циклопентадиенил, циклогексенил, циклогексадиенил и тому подобное.

[000142] Термин «арил» относится к углеводородной моноциклической, бициклической или трициклической ароматической кольцевой системе. Арильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов каждого кольца арильной группы могут быть замещены заместителем. Примеры арильных групп включают фенил, нафтил, антраценил, флуоренил, инденил, азуленил и тому подобное.

[000143] Термин «биарил» относится к ароматической кольцевой системе, содержащей субструктуру, которая представляет собой сборку двух ароматических колец или арильных групп, если они соединены одинарной связью. Арильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями. Примеры биарильных групп включают бифенил, бинафтил и тому подобное.

[000144] Термин «гетероарил» относится к моноциклической, бициклической или трициклической ароматической кольцевой системе, содержащей по меньшей мере один гетероатом, содержащей атомы углерода (также называемые членами кольца) и гетероатомные члены кольца, независимо выбранные из N, O, P или S и полученные путем удаления одного атома углерода от кольцевого атома исходной кольцевой системы. Примеры гетероарильных групп включают фуран, тиофен, пиррол, тиазол, оксазол, пиридин, пиазин и тому подобное.

[000145] В настоящей заявке термины «алкилциклоалкил», «алкиларил», «алкилбиарил» и «алкилгетероарил» относятся к насыщенной или ненасыщенной углеводородной цепи, которая может представлять собой линейную цепь или разветвленную цепь, содержащую от 1 до 8 атомов углерода, и может содержать тройную связь углерод-углерод и/или sp^2 -гибридизованные атомы углерода двойных связей, связанной с циклоалкилом, арилом, биарилом или гетероарилом. Различные циклические структуры определены выше. Циклоалкильные, арильные, биарильные или гетероарильные и/или алкильные группы необязательно могут быть замещены одним или более заместителями. Sp^2 или sp -атомы углерода алкенильной группы и алкинильной группы, соответственно, необязательно могут представлять собой место присоединения алкенильной или алкинильной групп.

[000146] Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения остаток R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного

алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения остаток R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного алкила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила. Согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения остаток R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила, C₃-C₆ циклоалкила, C₁-C₃ алкила C₃-C₆ циклоалкила, C₆-C₁₄ арила, C₁-C₃ алкила C₆-C₁₄ арила, гетероарила, C₁-C₃ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₃ алкилбиарила. Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения остаток R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного циклогексила, фенила, бензила, бифенила, пиридила или оксазолила. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения остаток R представляет собой замещенный или незамещенный фенил.

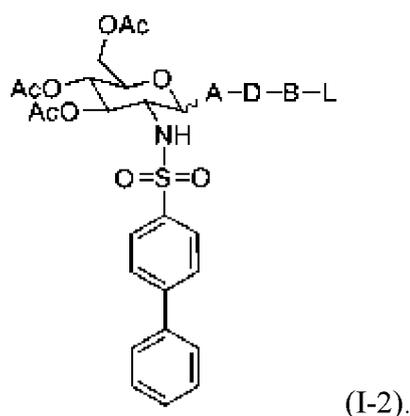
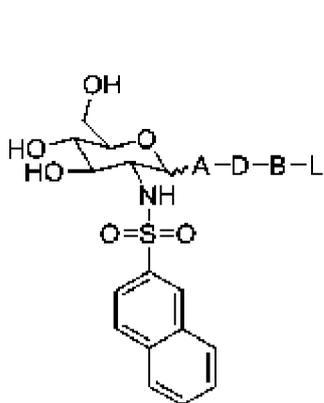
[000147] Заместители остатка R могут представлять собой любой подходящий заместитель, который не затрудняет связывание лиганда с лангерином. Более того, заместители могут представлять собой один или более заместителей как одного и того же типа, так и разных типов. Заместители R могут иметь любой профиль замещения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения заместители остатка R независимо выбраны из группы, состоящей из -N(R^a)(R^b), -OR^a, -SR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)(R^b), -N(R^a)C(O)R^b, -N(R^a)S(O)₂R^b, -OS(O)₂R^a, галогена, -NO₂, -CN, -NC, -N₃, -NCO, -OCN, -NCS, -SCN, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, арила и гетероарила. R^a и R^b могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₈ алкила, C₂₋₈ алкенила, C₂₋₈ алкинила, C₃₋₆ циклоалкила, арил-C₁₋₅ алкила, гетероарил-C₁₋₅ алкила, арила, гетероарила. Согласно предпочтительному варианту реализации R^a и R^b могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, метила и этила.

[000148] Более предпочтительно заместители остатка R независимо выбраны из группы, состоящей из NH₂, -OH, -OCH₃, -C(O)CH₃, -NHC(O)CH₃, -F, -Cl, -Br, -NO₂, -CN, C₁-C₄ алкила и фенила, бифенила и нафтила. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения остаток R представляет собой замещенный фенильный остаток. Этот фенильный остаток может быть замещен 5 заместителями. Более предпочтительно фенильный остаток может быть моно-, ди- или тризамещенным. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения

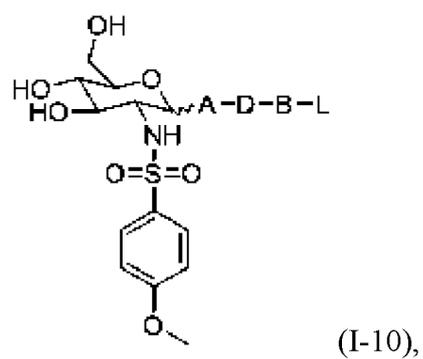
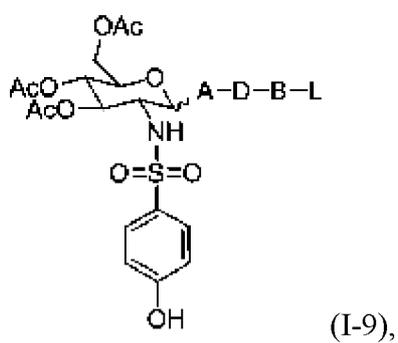
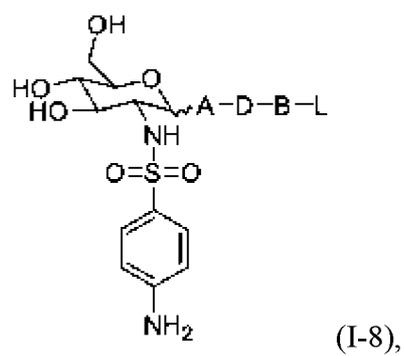
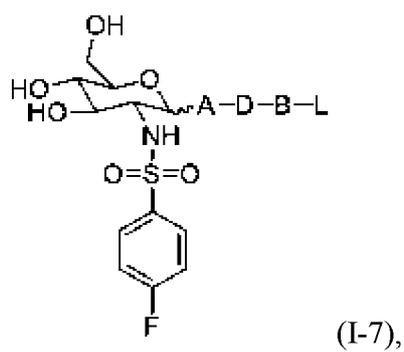
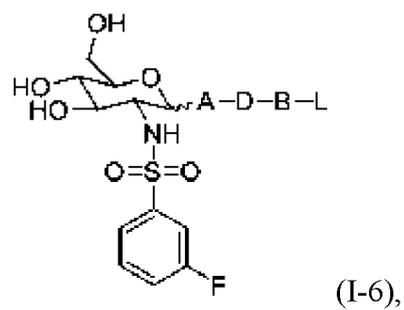
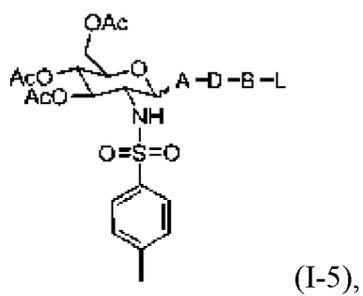
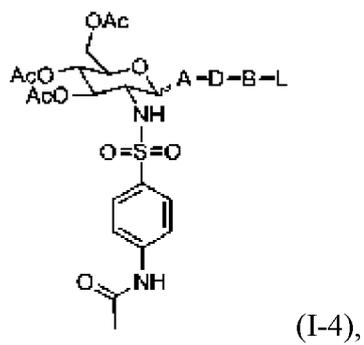
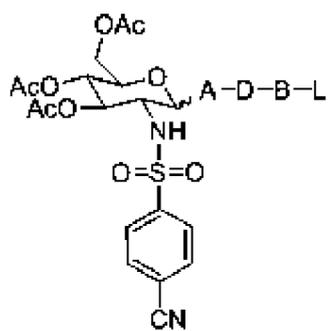
остаток R представляет собой монозамещенный фенильный остаток, в котором заместители выбраны из группы, состоящей из -NH₂, -OH, -OCH₃, -C(O)CH₃, C(O)NH₂, -C(O)NHCH₃, -CH₂OH -NHC(O)CH₃, -F, -Cl, -Br, -NO₂, -CN, C₁-C₄ алкила, нафтила и фенила. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения заместители находятся в пара-положении относительно лиганда. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения заместители в пара-положении и заместители фенила независимо выбраны из группы, состоящей из -NHC(O)CH₃, -CN, -CH₃, -F, -C(O)NH₂, -NH₂, -C(O)NHCH₃, -CH₂OH и фенила. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения заместители находятся в мета-положении относительно лиганда.

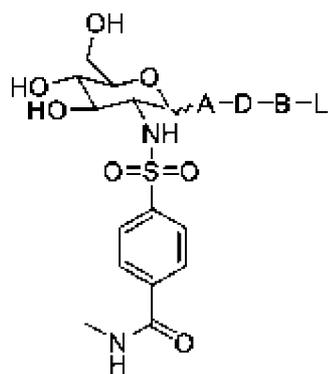
[000149] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения R' может быть независимо выбран из группы, состоящей из -OR^a и -NHS(O)₂R^a, где R^a определен выше. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения R' может быть выбран из группы, состоящей из -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃ или -NHS(O)₂R^a, где R^a определен выше. Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения -OH или -NHS(O)₂R^a, где R^a определен выше. Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения R' представляет собой -OH, -NHS(O)₂CH₃ или N-тозил. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения R' представляет собой -OH.

[000150] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат, упомянутый выше, представляет собой конъюгат следующей формулы (I-1) или (I-2):

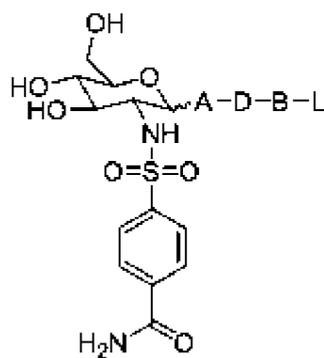


[000151] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат, упомянутый выше, представляет собой конъюгат любой из следующих формул (I-3)-(I-15):

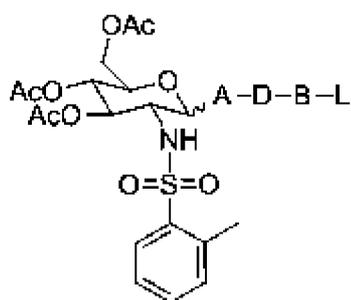




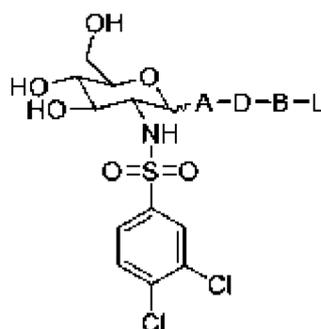
(I-11),



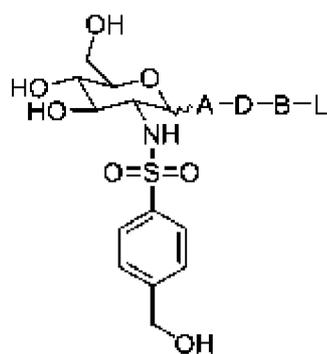
(I-12),



(I-13),



(I-14) или



(I-15).

[000152] Выражения «линкерная группа A-D-B-L», «A-D-B-L» или «линкерная группа» относятся к группе, состоящей из спейсера A-D-B и линкера L. Группа соединяет производное глюкозы-лиганд с носителем. В типичном варианте реализации на одном конце линкер L общей формулы (I), описанной выше, связан за счет спейсера A-D-B со структурой лиганда лангерина, определенной выше, которая содержит производное глюкозы формулы (I). Спейсер A-D-B ковалентно связан с положением C1 упомянутого производного глюкозы. Также предусмотрено, что спейсер A-D-B ковалентно связан с положением C6 упомянутого производного глюкозы.

[000153] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения линкерная группа A-D-B-L между лигандом и носителем представляет собой молекулярную цепь. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего

изобретения указанная основная цепь может иметь общее число атомов углерода, атомов азота и атомов кислорода, содержащихся в основной цепи, по меньшей мере 4, предпочтительно от 4 атомов до 600 атомов, более предпочтительно от 15 атомов до 400 атомов и еще более предпочтительно от 25 атомов до 200 атомов, например, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 и 200 атомов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения длина основной цепи линкера может составлять от приблизительно 0,4 нм до приблизительно 400 нм и более предпочтительно от приблизительно 0,6 нм до 100 нм, например, 0,6, 0,8, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 нм. Размер или длину линкера можно измерить с помощью измерений методом аналитического центрифугирования или измерений SAXS, например, как описано в Fuji et al., ACS Symposium Series, 2017, 1271, «Control of Amphiphile Self-Assembling at the Molecular Level: Supra-Molecular Assemblies with Tuned Physicochemical Properties for Delivery Applications», Chapter 5, pages 115-129. Средняя длина цепи может быть измерена с помощью подходящих методик измерения, например, как описано в Needham and Kim, 2000, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 18, 3-4, 183-195 или в Stepniwieski et al., 2011, Langmuir, 27(12), 7788-7798.

[000154] В настоящей заявке термин «линкер L» или «L» также относится к соединению, которое можно применять для связывания лиганда лангерина согласно настоящему изобретению, определенного в настоящей заявке выше, и носителя, непосредственно или опосредовано, например, за счет спейсера A-D-B. Предусмотренная связь может быть обеспечена любым подходящим химическим соединением, предпочтительно за счет ковалентных связей.

[000155] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанный линкер L может содержать один или более из синтетических полимеров или природных полимеров или одно или более отдельных звеньев этих полимеров или их комбинацию. Линкер согласно настоящему изобретению предпочтительно является биосовместимым и/или биоразлагаемым. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения линкер может представлять собой синтетический водорастворимый полимер, который растворяется, диспергируется или набухает в воде и, таким образом, модифицирует физические свойства водных систем в форме гелеобразования, загустения или эмульгирования/стабилизации. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения синтетический полимер может представлять собой насыщенный или ненасыщенный углеводородный полимер; полиамин; полиамид; сложный полиэфир; простой полиэфир, такой как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль; блок-сополимер или поллоксамер. Согласно

особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения линкер представляет собой полиэтиленгликоль. В соответствующих конкретных вариантах реализации настоящего изобретения полиэтиленгликолевый линкер может иметь длину от приблизительно 0 до 150, более предпочтительно от 1 до 100, еще более предпочтительно от 3 до 50 повторяющихся звеньев ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). Другие примеры подходящих полимеров представляют собой поливинилпирролидон, сополимер поливинилпирролидона и винилацетата, поливиниловый спирт, полистирол, полиакриловую кислоту, полиациламиды, N-(2-гидроксипропил)метакриламид и полиоксазолин.

[000156] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения природные полимеры, которые могут быть подходящими линкерами, выбраны из группы, состоящей из углеводов, модифицированных углеводов, пептидов, модифицированных пептидов, липидов и модифицированных липидов.

[000157] В настоящей заявке термин «углевод» относится к любому природному или синтетическому углеводу. Термин может дополнительно включать триозы, тетрозы, пентозы, гексозы и гептозы. Углеводы могут представлять собой альдозы или кетозы. Углеводы могут быть в D- или L-форме. Углеводы могут содержать один или более моносахаридов или дисахаридов. Углевод может образовывать олигосахарид, содержащий от 3 до 9 моносахаридов. Углевод также может представлять собой полисахарид, который содержит более 9 моносахаридов. Термин «моносахарид» включает, но не ограничивается ими, треозу, рибулозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, рибозу, арабинозу и маннозу. Моносахариды, содержащиеся в дисахаридах, олигосахаридах и полисахаридах, могут быть связаны друг с другом в любой конфигурации. Термин «дисахарид» включает, но не ограничивается ими, сахарозу, лактозу и мальтозу. Термин «олигосахарид» включает, но не ограничивается ими, мальтодекстрины и целлодекстрины. Термин «полисахарид» включает, но не ограничивается ими, крахмал, целлюлозу и хитин. Природные углеводы включают природные моносахариды. Синтетические углеводы могут содержать D- и L-, модифицированные, синтетические, нетипичные моносахариды и производные моносахаридов. «Производное моносахарида», также называемое «модифицированными углеводами», включает моносахариды, имеющие замены, или модификации исходных моносахаридов путем ковалентного присоединения, например, путем алкилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т. п. В определение «производное моносахарида» также включены, например, один или более аналогов моносахарида с замещенными связями, а также другие модификации, известные в данной области техники. Предпочтительные углеводы представляют собой маннозу, глюкозу,

фукозу или ксилозу. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения также можно применять инозиты.

[000158] В настоящей заявке термин «липид» относится к любому природному или синтетическому липиду. Соответственно, он может содержать алифатические кислоты и их производные, включая три-, ди-, моноглицериды и фосфолипиды, глицеролипиды, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, сахаролипиды, поликетиды, стериновые липиды и преноловые липиды, включая DSPE (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицероил-3-фосфохолин), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицероил-3-фосфоэтаноламин), DMPC (1,2-димиристоил-sn-глицероил-3-фосфохолин), DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицероил-3-фосфохолин), мембранные липиды и фосфатидилхолин, а также их модифицированные варианты. Предпочтительные липиды представляют собой DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицероил-3-фосфохолин), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицероил-3-фосфоэтаноламин), DMPC (1,2-димиристоил-sn-глицероил-3-фосфохолин), DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицероил-3-фосфохолин) или DSPE (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин). Термин «модифицированные липиды» означает липид, имеющий одну или более модификаций. Модификация такого липида может содержать ацетилирование, гликозилирование, алкилирование, комбинацию с хелатором или дополнительную функционализацию, такую как обеспечение чувствительности к pH, добавление карбоновых кислот, биотина, аминов, тиоэтанола, азидных групп и т. д. Липиды также можно комбинировать с усилителями гибкости, эластичности и/или проницаемости. Дополнительные подробности известны квалифицированному специалисту или могут быть получены из подходящих литературных источников, таких как Benson, 2017, *Methods Mol. Biol.*, 1522: 107-117, Sala et al., 2018, *Int J. Pharm.* 535 *Molecular Cell Biology*, 201(1-2), 1-17 или Harayama and Riezman, *Nature Reviews*, 2018 8, 19, 281–296.

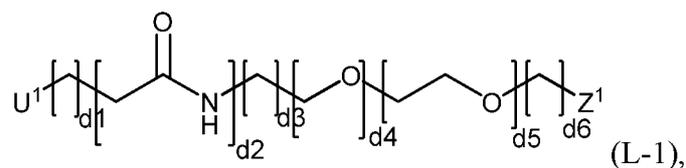
[000159] В настоящей заявке термин «пептид» относится к любому типу аминокислотной последовательности, содержащей более 2 аминокислот или их функциональных производных. Кроме того, пептид можно комбинировать с другими химическими группами или видами функциональной активности или он может представлять собой синтетический пептид. Природные пептиды, как правило, содержат природные аминокислоты. Синтетические пептиды могут содержать D- и L-, модифицированные, синтетические или неприродные аминокислоты и производные аминокислот. Природные пептиды содержат природные аминокислоты. Синтетические пептиды могут содержать D- и L-, модифицированные, синтетические, нетипичные аминокислоты и производные аминокислот. «Производное аминокислоты» включает

аминокислоту, имеющую замены, или модификации исходной аминокислоты путем ковалентного присоединения, например, путем алкилирования, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т. п. В определение «производное аминокислоты» дополнительно включены, например, один или более аналогов аминокислоты с замещенными связями, а также другие модификации, известные в данной области техники. «Природная аминокислота» относится к аргинину, глутамину, фенилаланину, тирозину, триптофану, лизину, глицину, аланину, гистидину, серину, пролину, глутаминовой кислоте, аспарагиновой кислоте, треонину, цистеину, метионину, лейцину, аспарагину, изолейцину и валину, если иное не указано в контексте. Предпочтительный пептид в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой олиго-L-глутаминовую кислоту или олиго-L-лизин. Другие предпочтительные пептиды могут представлять собой амфипатические пептиды, соединяющиеся с носителями на основе липидов путем вставки, например, последовательности VLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 81), с коротким N-концевым ди-L-глициновым линкером. Пептиды можно отличить от полипептидов. «Полипептид», например, может иметь от более чем 20 до 50 аминокислот в длину. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения линкер также может представлять собой полипептидный линкер. В настоящей заявке термин «белок» относится к группировке одного или более полипептидов. Соответственно, белок может содержать или состоять из одного полипептида и, таким образом, является синонимом полипептида. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения белок может содержать 2 или более полипептидов, которые могут быть организованы в звенья или субъединицы более высокоорганизованной структуры в форме белка.

[000160] Другими примерами природных полимеров, которые являются водорастворимыми и могут подходящим образом применяться в качестве линкеров применительно к настоящему изобретению, являются пектин, производные хитозана, ксантановые камеди, производные хитозана, декстран, простые эфиры целлюлозы, гиалуроновая кислота, казеин, каррагинан, крахмал и производные крахмала и тому подобное.

[000161] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения линкер может представлять собой просто ковалентную связь. В такой ситуации структура носителя может быть непосредственно связана со спейсером A-D-B.

[000162] Согласно предпочтительному варианту реализации указанный линкер L представляет собой линкер следующей общей формулы (L-1)



в которой

U^1 представляет собой группу, соединенную за счет V со спейсером D , причем U^1 выбран из группы, состоящей из $-CH_2-$, $-CH=CH-$ или $-C\equiv C-$; U^1 также может представлять собой одинарную связь; предпочтительно U^1 представляет собой $-CH_2-$ или ковалентную связь Z^1 представляет собой группу, связывающую линкер с носителем, выбранную из группы, состоящей из $-O-$, $-S-$, $-N(R^d)-$, $-C(R^d)(R^e)-$, $-R^dC=CR^e-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)S-$, $-C(O)N(R^d)-$, $-N(R^d)C(O)-$, $-N(R^d)C(O)N(R^e)-$, $-N(R^d)C(S)N(R^e)-$, $-N(R^d)C(O)O-$, $-OC(O)N(R^d)-$, $-$ циклогексен-, $-$ триазолов-, $-NHS(O)_2-$, $-S(O)_2-$, $-OP(O)(H)O-$ или $-OP(O)(OH)O-$; Z^1 также может представлять собой одинарную связь; предпочтительно Z^1 представляет собой ковалентную связь, амид или карбонильную группу;

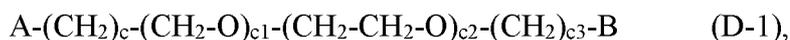
где R^d и R^e независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C_{1-32} алкила, C_{2-32} алкенила, C_{3-8} циклоалкила, арила, C_1-C_8 алкиларила, гетероарила, C_1-C_8 алкилгетероарила; и

каждый из d_1-d_5 представляет собой целое число от 0 до 100, предпочтительно целое число от 0 до 50, такое как 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50; d_6 представляет собой целое число от 1 до 100, предпочтительно целое число от 1 до 50, такое как 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50.

[000163] Как более подробно описано ниже, носитель или лиганд можно получить с применением части линкерного звена L , имеющего реактивный сайт для связывания с лигандом. Для синтеза конъюгата линкер может быть обеспечен как бифункциональный лиганд или бифункциональное звено. Линкерное звено L может иметь, соответственно, реактивный сайт, который имеет нуклеофильную группу, которая реагирует с электрофильной группой, присутствующей на лигандном звене или звене носителя. В качестве альтернативы лигандное звено или звено носителя может иметь, соответственно, реактивный сайт, который имеет нуклеофильную группу, которая реагирует с электрофильной группой, присутствующей на линкерном звене L . Электрофильная группа на лигандном звене или звене носителя обеспечивает удобный сайт для присоединения к линкерному звену, или, в качестве альтернативы, электрофильная группа на линкерном звене L обеспечивает удобный сайт для присоединения к лигандному звену или звену носителя. Подходящие электрофильные группы на лигандном или линкерном звене включают, но не ограничиваются ими, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы линкерного звена может реагировать с

электрофильной группой на лиганде и образовывать ковалентную связь с лигандом. В качестве альтернативы гетероатом нуклеофильной группы лигандного звена может реагировать с электрофильной группой на линкере и образовывать ковалентную связь с линкером. Подходящие нуклеофильные группы на линкерном звене или лигандном звене включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, амина, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения можно применять бифункциональный линкер, который несет одну группу ОН или который может представлять собой, например, общий нуклеофил, а также дополнительную функциональную группу. Вторая функциональная группа может представлять собой любой нуклеофил, несущий ортогональную защитную группу или функциональную группу, совместимую с реакциями гликозилирования и общими методами снятия защиты. Затем бифункциональный элемент может взаимодействовать с аномерным центром моносахарида за счет группы ОН. Впоследствии с моносахарида и второй функциональной группы снимают защиту. Затем продукт можно конъюгировать с соответствующим пегилированным липидом.

[000164] В настоящей заявке термин «спейсер» относится к любой структуре, ковалентно соединяющей линкер с производным глюкозы-лигандом согласно настоящему изобретению, как определено в настоящей заявке выше. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная спейсерная группа А-D-B содержит D в качестве спейсера, соединенного с А и В общей формулы (D-1)



в которой

D соединен с линкером L за счет В, причем В выбран из группы, состоящей из -O-, -S-, -C(R^{c1})(R^{c2})-, -S-S-, -N(R^{c1})-, -C(O)-, -C(R^{c1})=N-, -N=N-, -OC(O)-, -C(O)O-, -C(O)N(R^{c1})-, -N(R^{c1})C(O)-, -N(R^{c1})C(O)N(R^{c2})-, -N(R^{c1})C(S)N(R^{c2})-, -N(R^{c1})C(O)O-, -OC(O)N(R^{c1})-, -циклогексен- и -триазолов-; В также может представлять собой одинарную связь; предпочтительно В представляет собой ковалентную связь, амид или карбонильную группу;

где R^{c1} и R^{c2} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила и C₁-C₈ алкилгетероарила; предпочтительно R^{c1} и R^{c2} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

D соединен с производным глюкозы за счет А, причем А выбран из группы, состоящей из -O-, -CH₂-, -S-, -NH-, -NHC(O)-, -OC(O)-, -циклогексен- и -триазолов-; А также может

представлять собой одинарную связь; предпочтительно А представляет собой ковалентную связь, амид или карбонильную группу;

с представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20, предпочтительно с представляет собой 0, 1, 2 или 3; с1 представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20, предпочтительно с1 представляет собой 0, 1, 2 или 3; и с2 представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20, предпочтительно с2 представляет собой 0, 1, 2 или 3; с3 представляет собой целое число, выбранное от 1 до 20, предпочтительно с3 представляет собой 1, 2 или 3; если А представляет собой $-CH_2-$, с3 представляет собой целое число, выбранное от 0 до 20. Спейсерная группа D может представлять собой одинарную связь, одну или более метиленгликолевых групп, одну или более этиленгликолевых групп или углеводород или их смесь. Спейсер более предпочтительно представляет собой группу, выбранную из одинарной связи, $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$ или $-CH_2-CH_2-O-$. Таким образом, А и В могут быть соединены за счет одинарной связи.

[000165] В настоящей заявке термин «носитель» относится к любой структуре, которая может быть способна переносить груз к клетке или группе клеток. Соответственно, груз может быть ассоциирован, т. е. связан с носителем, или может содержаться в носителе, может быть заключен или включен в него. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения носитель также может быть предпочтительно способен вводить – после предшествующего взаимодействия ассоциированного лиганда, т. е. применительно к определенному выше конъюгату или средству для переноса, с клеткой-мишенью – транспортируемый груз в указанную клетку. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения носитель может содержать один или более типов груза. Эти грузы могут быть соединены с носителем одинаковым или различным образом. Например, один тип груза может быть связан с носителем, например, с внешней стороны, а другой тип груза может быть заключен в носитель или включен в него.

[000166] В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения носитель может быть связан или ассоциирован с конъюгатом, определенным в настоящей заявке, в соотношении 1:1, т. е. один носитель связан с одним конъюгатом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения носитель может быть связан с более чем одним конъюгатом. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения носитель связан менее чем с 10 конъюгатами. Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения носитель может быть связан менее чем со 100 конъюгатами. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения носитель может быть связан менее чем с 200

конъюгатами. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения соотношение между носителем и конъюгатом может быть различным, например, скорректированным в зависимости от формы носителя, предполагаемого груза, вторичных целей связывания и т. д. Например, может быть предусмотрено соотношение 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100 или 1:200 или более или любое соотношение (целые числа) в пределах упомянутых соотношений между носителем и конъюгатом. Согласно другим альтернативным вариантам реализации настоящего изобретения также может быть предусмотрено соотношение одного конъюгата и более чем одного носителя. Соответственно, может быть предусмотрено соотношение 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1 или более или любое соотношение в пределах упомянутых соотношений между носителем и конъюгатом.

[000167] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения носитель может представлять собой мягкую частицу. В настоящей заявке термин «мягкая частица» относится к частицам, которые являются эластичными, деформируемыми и, как правило, биоразлагаемыми или небіоперсистентными. Предпочтительными примерами мягких частиц являются липосомы, ниосомы, мицеллы, секвессомы[™] и трансферосомы. Мягкая частица, определенная выше, может содержать или может состоять из различных типов компонентов, например, липидов. Мягкая частица может содержать, например, один или более типов фосфолипидов; кроме того, мягкая частица может содержать дополнительный компонент, который может влиять, например, на стабильность, жесткость, связывающие способности, способность проникать в клетки, вторичные возможности нацеливания и т. д. Примером компонентов является холестерин, который, как правило, снижает текучесть двухслойной структуры и повышает стабильность липосомы. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения мягкая частица представляет собой липосому. Особенно предпочтительно частица содержит 57% DSPC, 38% холестерина и 5% DSPE-PEG.

[000168] «Липосома» представляет собой сферическую везикулу, имеющую по меньшей мере один бислой липидов, например, определенных в настоящей заявке выше. Липосомы могут содержать фосфолипиды, например, фосфатидилхолин, или могут включать другие липиды, такие как фосфатидилэтаноламин. Липосома может быть обеспечена в виде многослойной везикулы (MLV), т. е. содержащей несколько липидных бислоев в ламеллярной фазе, в виде небольшой однослойной липосомной везикулы (SUV), т. е. содержащей один липидный бислой, или большой однослойной везикулы (LUV). Липосома, как правило, имеет ядро из водного раствора, окруженное гидрофобной мембраной. Соответственно, гидрофобные соединения, растворенные в ядре, не могут

проходить через бислой, если указанный бислой не открыт, например, путем введения поры, или если бислой не сливается с другой двухслойной структурой, например, с клеточной мембраной, и тем самым доставляет содержимое липосомы в ядро второго бислоя, например, клетки. В свою очередь, гидрофобные соединения, как правило, ассоциируются с липидным бислоем и таким образом могут быть загружены в указанный компартмент липосомы. В качестве альтернативы липосома может быть доставлена к клетке путем вызова события эндоцитоза или фагоцитоза. Липосомы могут иметь разные размеры, что в значительной степени зависит от характера липида, ламеллярной структуры и наличия дополнительных факторов в липидном бислое, например, холестерина. Например, размер липосомы может варьировать от нескольких нанометров до 2000 нм. Размер липосом можно быть измерен с помощью любого подходящего анализа, известного квалифицированному специалисту, предпочтительно с помощью динамического рассеяния света (DLS).

[000169] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения липосома представляет собой двухслойную фосфолипидную липосому. Согласно настоящему изобретению предусмотрено, что размер указанной двухслойной фосфолипидной липосомы составляет от 10 до 500 нм. Размер липосомы может составлять, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 350, 400, 450 или 500 нм. Предпочтительно размер составляет от 30 до 250 нм, например, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240 или 250 нм. Также предусмотрены дополнительные размеры в пределах упомянутых размеров.

[000170] Было обнаружено, что предпочтительный размер липосом приблизительно 140 нм обеспечивает воспроизводимую стабильность липосом в течение нескольких месяцев.

[000171] Липосомы, включая двухслойную фосфолипидную липосому, могут содержать один или более дополнительных компонентов. Одним примером этих дополнительных компонентов является холестерин. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения холестерин может содержаться в липосоме предпочтительно в количестве от приблизительно 20 до 50 мол.%, например, в количестве приблизительно 20 мол.%, 25 мол.%, 30 мол.%, 35 мол.%, 40 мол.%, 45 мол.% или 50 мол.%, или любое подходящее значение в пределах упомянутых значений. Более предпочтительно он может присутствовать в количестве приблизительно 40%.

[000172] Липосомы также предпочтительно могут состоять из фосфолипидов, более предпочтительно из фосфатидилхолинов, но также могут содержать другие липиды, такие как яичный фосфатидилэтаноламин, при условии, что они совместимы с двухслойной

липидной структурой. Конкретно предусмотренные примеры фосфолипидов включают POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DPPG (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3[фосфо-рац-(1-глицерин)], DSPC (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DOPC (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DSPE (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DMPC (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DPPC (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), DMPE (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DPPE (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин), DMPA·Na (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфат (натриевая соль)), DPPA·Na (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфат (натриевая соль)), DOPA·Na (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3[фосфо-рац-(1-глицерин)] (натриевая соль), DMPG·Na (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3[фосфо-рац-(1-глицерин)] (натриевая соль), DPPG·Na (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3[фосфо-рац-(1-глицерин)] (натриевая соль), DMPS·Na (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфосерин) (натриевая соль), DPPS·Na (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфосерин (натриевая соль)) и DOPS·Na (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфосерин (натриевая соль)).

[000173] В настоящей заявке термин «ниосома» относится к везикуле на основе неионного поверхностно-активного вещества. Как правило, ниосома образована неионным поверхностно-активным веществом, относящимся к классу алкил- или диалкилполиглицеринового простого эфира, и холестерина с последующей гидратацией в водных средах. Ниосомы структурно сходны с липосомами в том, что они имеют бислой, но более стабильны благодаря своему составу. Они представляют собой небольшие однослойные везикулы (SUV, размер=0,025-0,05 мкм), многослойные везикулы (MLV, размер =>0,05 мкм) и большие однослойные везикулы (LUV, размер =>0,10 мкм). Примеры поверхностно-активных веществ, применяемых для получения ниосом, включают моностеарат сорбитана (Span-60), простой алкиловый эфир полиоксиэтилена и Span 40 (C16 G2).

[000174] Термин «мицелла», применительно к настоящему изобретению, означает агрегат молекул поверхностно-активного вещества, например, фосфолипидов, блок-сополимеров или трехблочных сополимеров, диспергированных в жидкости. Типичная мицелла в формах водного раствора образует агрегат с областями гидрофильных головок, находящихся в контакте с окружающим растворителем, изолирующих области с гидрофобными одиночными хвостами в центре мицеллы. Следовательно, мицелла имеет однослойную структуру. Мицеллы образуются при превышении критической концентрации мицеллообразования и, как правило, имеют диаметр от 1 до 100 нм. Полимерные мицеллы обычно более стабильны и, как правило, монодисперсны с диаметром от 20 до 50 нм. Более подробную информацию можно получить из подходящих

литературных источников, таких как Soussan et al., 2009, *Angew Chem Int Ed Engl.* 48(2), 274-88. Помимо этих мицелл с нормальной фазой существует другая группа обратных мицелл различной формы, в которых группы гидрофильных головок находятся в центре мицеллы, при этом хвосты выступают наружу. Форма и размер мицеллы зависят от молекулярной геометрии составляющих ее молекул поверхностно-активного вещества и условий раствора, таких как концентрация поверхностно-активного вещества или полимера, температура, pH и ионная сила. Примеры предусмотренных поверхностно-активных веществ включают катионные поверхностно-активные вещества, такие как DeTAB, DTAB, TTAB или CTAB; анионные поверхностно-активные вещества, такие как SDS или SDC; цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества, такие как SB-14 или CHAPS; или неионные поверхностно-активные вещества, такие как NOG, твин 20, твин 80 или тритон X. Вследствие их повышенной стабильности полимерные мицеллы представляют собой предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения. В соответствии с особенно предпочтительными вариантами реализации эти полимерные мицеллы содержат полимеры на основе полиэтиленоксида или биоразлагаемого углевода и глицерина, которые можно применять в качестве гидрофильной группы. Гидрофобная группа предпочтительно может состоять из биоразлагаемых полимеров на основе лактата. Согласно другому предпочтительному варианту обеспечены мицеллы, состоящие из pH-чувствительных блок-сополимеров. Такие мицеллы могут быть получены путем включения основных или кислотных функциональных групп, которые предпочтительно могут изменять растворимость полимеров и, следовательно, стабильность мицелл при различных значениях pH.

[000175] В настоящей заявке термин «секвессомы[™]» относится к ультрадеформируемым гидрофильным сферам, изготовленным из молекул фосфолипида и поверхностно-активного вещества, сгруппированных в виде бислоя. Включение поверхностно-активных веществ смягчает двухслойную мембрану, придавая гибкость везикулам секвессом, а также стабильность, что позволяет им проникать через кожу неповрежденными и проникать глубоко в тело без инъекций или усилителей проникновения через кожу. Более подробную информацию можно получить, например, из Benson, 2017, *Methods Mol. Biol.*, 1522: 107-117 или Sala et al., 2018, *Int J. Pharm.* 535 (1-2), 1-17.

[000176] В настоящей заявке термин «трансферосома» относится к агрегату носителя, состоящему по меньшей мере из одного амфипата, который в водных растворителях самопроизвольно собирается с образованием липидного бислоя, который смыкается в простую липидную везикулу. Как правило, амфипат представляет собой

фосфатидилхолин. С помощью добавления по меньшей мере одного компонента, смягчающего бислоя, например, биосовместимого поверхностно-активного вещества или амфифильного лекарственного средства, можно повысить гибкость и проницаемость липидного бислоя. Полученная трансферосома оптимизирована в отношении гибкости и проницаемости и, следовательно, ее форму можно легко и быстро адаптировать к условиям окружающей среды, корректируя локальную концентрацию каждого компонента бислоя в соответствии с локальным напряжением, которое испытывает бислой. Трансферосома, как правило, отличается от более обычных везикул или липосом, прежде всего своей более мягкой, более деформируемой и лучше корректируемой искусственной мембраной. Трансферосома также, как правило, имеет повышенную аффинность к связыванию и удержанию воды. Безотносительно к какой-либо теории, предполагается, что ультрадеформируемые и высокогидрофильные везикулы, такие как трансферосомы, как правило, избегают дегидратации, которая может включать процесс транспорта, связанный с прямым осмосом. Предпочтительно трансферосома, нанесенная на открытую биологическую поверхность, в частности, на кожу, как правило, проникает через ее барьер и мигрирует в более глубокие богатые водой слои, чтобы обеспечить адекватную гидратацию. Проникновение через барьер может включать обратимую деформацию бислоя, но не должно нарушать ни целостность везикул, ни барьерные свойства, чтобы основная аффинность в отношении гидратации и градиент оставались неизменными. Более подробную информацию можно получить, например, из Venson, 2017, *Methods Mol. Biol.*, 1522: 107-117 или Sala et al., 2018, *Int J. Pharm.* 535 (1-2), 1-17.

[000177] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения часть мягкой частицы, например, взаимодействующая группа или соединение, связана непосредственно за счет ковалентной связи или за счет

группы, выбранной из группы, состоящей из -O-, -S-, -N(R^d)-, -C(R^d)(R^e)-, -R^dC=CR^e-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)S-, -C(O)N(R^d)-, -N(R^d)C(O)-, -N(R^d)C(O)N(R^e)-, -N(R^d)C(S)N(R^e)-, -N(R^d)C(O)O-, -OC(O)N(R^d)-, -циклогексен-, -триазолов-, -NHS(O)₂-, -S(O)₂-, -OP(O)(H)O- или -OP(O)(OH)O-;

где R^d и R^e независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₃₂ алкила, C₂₋₃₂ алкенила, C₃₋₈ циклоалкила, арила, C₁₋₈ алкиларила, гетероарила, C₁₋₈ алкилгетероарила,

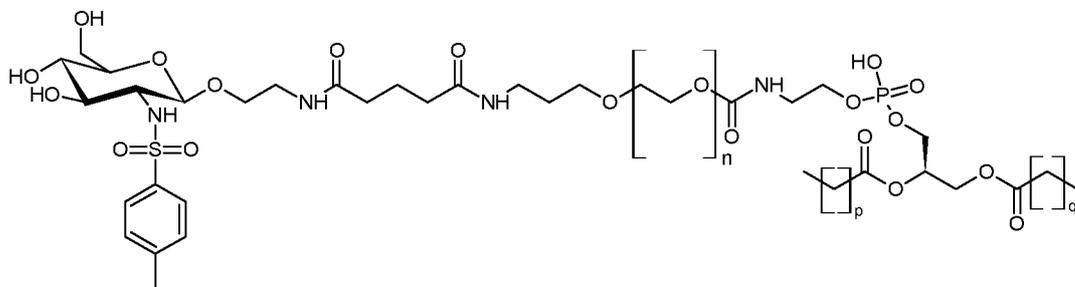
например, за счет Z¹, определенного в настоящей заявке выше, с линкерной группой A-D-V-L конъюгата, определенного в настоящей заявке выше.

[000178] Термин «одна часть мягкой частицы» относится к типичному компоненту мягкой частицы, например, липосомы, такому как липид, модифицированный липид,

фосфолипид, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE), мембранный липид или модифицированный фосфатидилхолин, или холестерин, который ковалентно соединен с лигандом лангерина, определенным в настоящей заявке, за счет линкерной группы A-D-B-L. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат, содержащий лиганд лангерина и линкерную группу A-D-B-L, может содержать гидрофобную область, которая в настоящей заявке также называется «хвостовой областью», а также гидрофильную область, которая также содержит лиганд лангерина, также называемую «головной областью». Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения хвостовая область конъюгата может быть встроена в двухслойную липидную структуру, в то время как головная область расположена вне носителя и, таким образом, способна взаимодействовать с рецепторами. Пример такого встраивания схематически изображен на Фиг. 26, на которой показана хвостовая область конъюгата, вставленная в двухслойную липидную структуру, которая является частью носителя на основе мягкой частицы, например, липосомы. Головная область конъюгата содержит, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, гибкий линкер между лигандом и липидом, что обеспечивает взаимодействие с когнатным рецептором. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения длина этого линкера может быть адаптирована для поддержания минимального расстояния между лигандом и поверхностью мягкой частицы, например, липосомы. Согласно настоящему изобретению также предусмотрено наличие более чем одного конъюгата в таком липидном бислое или липосоме, упомянутых выше. Количество конъюгатов и расстояние между ними в бислое можно корректировать, например, во взаимосвязи с количеством и частотой когнатных рецепторов на поверхности лангерин⁺ клетки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат может быть связан с частью мягкой частицы, например, с липидной молекулой или холестерином, которая образует часть липосомы, мицеллы или сходной структуры. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения липиды, связанные с конъюгатом, и липиды, которые не связаны с конъюгатом, имеют конкретное соотношение приблизительно 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, предпочтительно 1:20. Согласно дополнительным конкретным вариантам реализации настоящего изобретения количество конъюгатов, связанных с липидом, также может быть определено как количество конъюгатов, присутствующих на nm^2 площади липидного бислоя. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения это количество должно быть адаптировано к размеру периметра липосомы. Например, для липосом с периметром 160 нм конъюгаты могут присутствовать в количестве от приблизительно 0,05 до 0,075 на

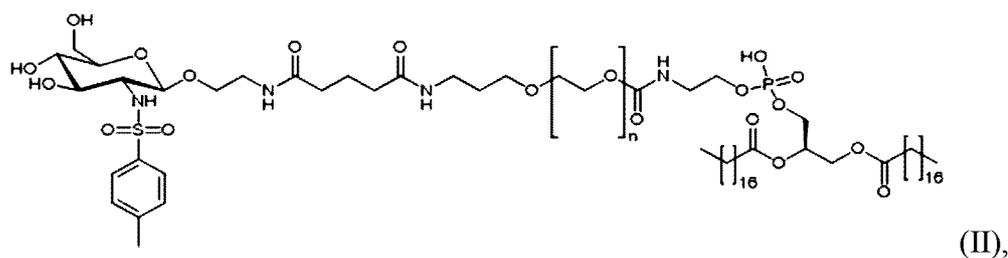
нм². В очень конкретном варианте конъюгаты могут присутствовать в количестве приблизительно 0,67 на нм².

[000179] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения конъюгат связан с одной частью носителя на основе мягкой частицы, что приводит к следующей формуле (II-a):



в которой p и q каждый независимо представляет собой целые числа от 6 до 30; более предпочтительно p и q каждый независимо представляет собой целые числа от 8 до 28, еще более предпочтительно p и q каждый независимо представляет собой 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28; n представляет собой целое число от 0 до 150, предпочтительно целое число от 10 до 100 и более предпочтительно целое число от 20 до 75. Согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения n представляет собой 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75. Согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения n представляет собой 45.

[000180] Согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения конъюгат связан с одной частью носителя на основе мягкой частицы, что приводит к следующей формуле (II):



в которой среднее число звеньев этиленгликоля n представляет собой целое число от 0 до 150, предпочтительно целое число от приблизительно 20 до 110 и более предпочтительно целое число от приблизительно 40 до 70.

[000181] Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения n составляет приблизительно 40, 50, 55, 60 или 70. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения n составляет приблизительно 59. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения применяют линкер ПЭГ. Особенно предпочтительным является 3-(N-

сукцинимидилоксиглутарил)аминопропил, полиэтиленгликоль-карбамилдистеароилфосфатидилэтаноламин. Линкер ПЭГ может иметь любую подходящую массу. Например, масса может составлять от приблизительно 1500 до 10000 Да, например, 1500, 2000, 2500, 3000, 3200, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 Да, или любое значение в пределах упомянутых значений. Также предусмотрен диапазон приблизительно от 2000 до 5000 Да. Особенно предпочтительным является применение линкера ПЭГ с молекулярной массой 2000 Да.

[000182] Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения носитель может иметь твердую структуру, может представлять собой наночастицу, пептид, белок, токсин, дендример, фуллерен или углеродную нанотрубку. Конъюгат может быть непосредственно связан за счет ковалентной связи с носителем или за счет

группы, выбранный из группы, состоящей из -O-, -S-, -N(R^d)-, -C(R^d)(R^e)-, -R^dC=CR^e-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)S-, -C(O)N(R^d)-, -N(R^d)C(O)-, -N(R^d)C(O)N(R^e)-, -N(R^d)C(S)N(R^e)-, -N(R^d)C(O)O-, -OC(O)N(R^d)-, -циклогексен-, -триазолов-, -NHS(O)₂-, -S(O)₂-, -OP(O)(H)O- или -OP(O)(OH)O-;

где R^d и R^e независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₃₂ алкила, C₂₋₃₂ алкенила, C₃₋₈ циклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила;

например, за счет Z¹, определенного в настоящей заявке выше, с носителем. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгат может быть дополнительно связан с носителем за счет дополнительного спейсерного элемента.

[000183] В настоящей заявке термин «спейсерный элемент» относится к любой подходящей группе или к природному или синтетическому полимеру. Особенно предпочтительно указанный природный или синтетический полимер представляет собой природный или синтетический полимер, определенный выше.

[000184] В настоящей заявке термин «наночастица» относится к частицам размером от 1 до 1000 нм, предпочтительно от 5 нм до 1000 нм, как правило, с окружающим межфазным слоем. Наночастица по существу ведет себя как единое целое в отношении ее транспорта и свойств. Следовательно, частицы и их поверхности, соответственно, могут иметь симметричную, шаровидную, по существу шаровидную или сферическую форму или могут иметь неправильную, асимметричную форму или очертание. Размер частицы (и, следовательно, размер поверхности) может варьировать. Предпочтительными являются частицы и поверхности частиц в нанометровом диапазоне до нескольких сотен нанометров. Особенно предпочтительными являются наночастицы от приблизительно 1

до 700 нм. Особенно предпочтительными являются наночастицы, которые могут иметь диаметр от приблизительно 10 до 600 нм, например, 10 нм, 15 нм, 20 нм, 25 нм, 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 120 нм, 150 нм, 170 нм, 200 нм, 220 нм, 250 нм, 270 нм, 300 нм, 320 нм, 350 нм, 370 нм, 400 нм, 420 нм, 450 нм, 470 нм, 500 нм, 520 нм, 550 нм, 570 нм, 600 нм, 620 нм или любое промежуточное значение. Еще более предпочтительными являются наночастицы, имеющие диаметр приблизительно 500 нм. Наночастицы могут состоять из любого подходящего материала, известного квалифицированному специалисту в данной области техники, например, они могут содержать, состоять или по существу состоять из неорганического или органического материала. Как правило, они могут содержать или состоять, или по существу состоять из металла или сплава металлов, или органического материала, или могут содержать или состоять, или по существу состоять из углеводных элементов, или смеси вышеупомянутых материалов. Примеры предусмотренного материала также включают агарозу, полистирол, латекс, поливиниловый спирт, диоксид кремния и ферромагнитные металлы, сплавы или композитные материалы. Дополнительные предусмотренные примеры материалов наночастиц включают золото, серебро, кремний, оксид церия, железо, диоксид титана, оксид цинка, глину, оксид алюминия, оксид меди, карбиды металлов, нитриды металлов, например, нитрид алюминия или нитрид кремния, алюминий или медь.

[000185] Как правило, ионный заряд поверхности или поверхностного покрытия наночастиц определяет многие из их физических и химических свойств, включая стабильность, растворимость и нацеливание. Для вариантов биологического применения, которые предусмотрены в данном случае, предусмотрено покрытие, придающее высокую растворимость в воде и предотвращающее агрегацию наночастиц. На поверхности клетки покрытия с высокой плотностью заряда, как правило, стимулируют неспецифичное связывание, в то время как полиэтиленгликоль, связанный с концевыми гидроксильными или метоксигруппами, может отклонять неспецифические взаимодействия.

[000186] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения наночастица может содержать один или более поверхностных слоев. Например, предусмотрено, что присутствует первый слой или оболочечная структура. Также предусмотрены многослойные или сетчатые структуры. Такие структуры могут содержать в качестве структурных компонентов, например, ПЭГ, биотин и стрептавидин. Оболочечная структура может содержать конъюгат в соответствии с настоящим изобретением или, помимо этого, другие аффинные молекулы, например, антитела, лиганды для различных рецепторов, партнеров белков, лектины и т. д. Согласно другим

конкретным вариантам реализации настоящего изобретения поливалентность стрептавидина, как правило, приводит к получению сетки из неаффинных спейсерных молекул на поверхности наночастицы. Такая сетчатая структура вокруг взаимодействующей или нацеливающей молекулы, например, конъюгата в соответствии с настоящим изобретением, или дополнительной аффинной молекулы, упомянутой выше, неспецифическое связывание молекул или частиц с взаимодействующей или нацеливающей молекулой или аффинной молекулой, или с молекулами поблизости от нее, могут быть уменьшены, полностью устранены или исключены.

[000187] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения наночастица может состоять из биоразлагаемой структуры или может иметь ее. В настоящей заявке термин «биоразлагаемый» означает, что наночастица может быть разъединена на части или разрушена с помощью природных процессов, происходящих в клетке или в окружении клетки, т. е. вне клетки. Соответственно, биоразлагаемые наночастицы могут обладать повышенной биосовместимостью, хорошей способностью инкапсулировать грузы, такие как нуклеиновые кислоты, белки или низкомолекулярные лекарственные средства. Биоразлагаемые наночастицы могут быть получены из целого ряда материалов, таких как белки, полисахариды и синтетические биоразлагаемые полимеры. Выбор основного полимера основывается на различных конструкциях и критериях конечного применения. Он зависит от многих факторов, таких как размер целевых наночастиц, свойства груза (растворимость в воде, стабильность и т. д.), который должен быть инкапсулирован в полимере, характеристик и функциональности поверхности, степени биоразлагаемости и биосовместимости, а также профиля высвобождения груза готового продукта. В зависимости от выбора целевых критериев для получения наночастиц способы, которые будут применяться для получения биоразлагаемых наночастиц, могут включать диспергирование заранее полученных полимеров, полимеризацию мономеров и метод ионного гелеобразования для гидрофильных полимеров. Особенно предпочтительным является применение полимолочной кислоты (PLA), поли-D/L-гликолида (PLG), поли-ε-капролактона (PCL), сополимера D/L-лактида и гликолида (PLGA) и полицианоакрилата (PCA), хитозана, желатина, полиалкилцианоакрилатов (PAC). Наиболее предпочтительным вариантом биоразлагаемых наночастиц являются наночастицы PLGA. Например, наночастицы или полимерные структуры, присутствующие на поверхности наночастицы, могут разлагаться ферментами, такими как липазы, эстеразы, алкалазы, гидроксилазы, диоксигеназы и т. д.

[000188] Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения носитель на основе наночастицы может быть ассоциирован с агентом,

проникающим в клетки, или может обеспечивать его. Такой агент может представлять собой, например, полиArg-пептид TAT, пептид пенетратин, полиаргининовый или полилизинный пептид, пептид, содержащий катионные последовательности сигнала ядерной локализации, катионные группы, связанные с каркасами, например, пептидами, олигокарбаматами, лолигомами или олигомерами PNA. Более подробная информация может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Fillon et al., 2005 J. Am. Chem. Soc, 127, 11798-11803.

[000189] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения наночастицы могут быть дополнительно связаны с биологическими молекулами, которые направляют наночастицы к конкретным сайтам внутри тела, к конкретным органеллам внутри клетки или для отслеживания определенным образом перемещения отдельных молекул белка или РНК в живых клетках. Такие аффинные молекулы могут включать, помимо конъюгатов, определенных в настоящей заявке, аптамеры или пептиды. Эти аффинные молекулы, как правило, ковалентно связаны с наночастицей или со слоями на ее поверхности. Предпочтительно указанные конъюгаты или аффинные молекулы присутствуют в заданном количестве на наночастицу. Поливалентные наночастицы, содержащие более одного конъюгата в соответствии с настоящим изобретением, несущие несколько нацеливающих групп, могут кластеризовать рецепторы, которые могут активировать определенные клеточные сигнальные пути, и обеспечивают более сильное закрепление. Моновалентные наночастицы, несущие один сайт связывания или один конъюгат, как правило, избегают кластеризации. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения предусмотрены поливалентные наночастицы. Количество конъюгатов на наночастицу можно корректировать в соответствии с размером наночастицы. Например, применительно к настоящему изобретению можно применять соотношение 2:100 или 5:100 конъюгатов на наночастицы.

[000190] Связь между конъюгатом в соответствии с настоящим изобретением и наночастицей может быть обеспечена в любой подходящей форме. Например, связь может быть обеспечена за счет разных видов межмолекулярного притяжения между наночастицей и биомолекулой, такого как ковалентное связывание, адсорбция, такая как хемосорбция, и нековалентные взаимодействия. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения связь может представлять собой интеграцию липосом в двухслойную структуру, например, клетки. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения связь можно осуществлять за счет лиганда, который ковалентно связан с рецепторной структурой на клетке. Также предусмотрены наночастицы, которые проникают в клетку или которые адсорбируются на клетке. Особенно предпочтительным

является применение поглощения липосом за счет эндосомального пути. Безотносительно к какой-либо теории, предполагается, что доставленные липосомы будут высвобождаться в эндосомальном компартменте. Высвобождение самого груза из бислоя липосомы впоследствии может быть обеспечено липазами, которые, как предполагается, разрушают липосому в поздней эндосоме или лизосомальном компартменте. Предпочтительно высвобождение груза осуществляется в ранних эндосомах. Дополнительные факторы, которые могут влиять на высвобождение груза, включают показатель pH, на который, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, можно влиять или который можно изменять для контроля высвобождения указанного груза. Согласно настоящему изобретению также предусмотрена адаптация эндосомной формы за счет концентрации и/или композиции липидного бислоя липосом.

[000191] Наночастица, предусмотренная согласно настоящему изобретению, предназначена для применения в качестве носителя для транспортировки груза. Соответственно, наночастица связана с одной или более молекулами груза, описанными в настоящей заявке, которые, как правило, обеспечены на поверхности частицы. Эти молекулы груза также могут быть связаны с наночастицей в любой подходящей форме, например, за счет межмолекулярного притяжения, ковалентной связи, адсорбции, такой как хемосорбция, и нековалентных взаимодействий. Количество груза на наночастицу можно корректировать с учетом размера наночастицы, ее материала, ее формы и размера и/или формы груза. Как правило, может быть обеспечено соотношение 1 наночастица:1-1000 частиц груза.

[000192] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения наночастица может быть обеспечена в виде магнитной наночастицы, например, в виде суперпарамагнитной частицы. Соответственно, предпочтительными материалами являются магнитные или ферромагнитные металлы, сплавы или композиции. Такие частицы, в частности, можно применять в отношении методик магнитно-резонансной визуализации. Особенно предпочтительно наночастица представляет собой наночастицу золота, серебра или железа.

[000193] Наночастицы могут быть обеспечены в виде коллоида или могут содержаться внутри коллоида. В настоящей заявке термин «коллоид» относится к коллоидной системе, в которой полимолекулярные частицы диспергированы в среде, имеющей от 1 нм до 1 мкм по меньшей мере по одному измерению. В качестве альтернативы в системах могут быть обнаружены неоднородности на расстояниях от 1 нм до 1 мкм. Как правило, коллоид представляет собой смесь, которая содержит твердые частицы, например, наночастицы, определенные в настоящей заявке, диспергированные в

жидкой среде. Термин, как правило, применяется, если частицы больше атомных размеров, но достаточно малы, чтобы проявлять броуновское движение, при этом диаметр частиц, как правило, варьируется от нанометров до микрометров.

[000194] В настоящей заявке термин «пептидный носитель» или «белковый носитель» относится к пептидным или белковым структурам, определенным в настоящей заявке выше, которые играют роль носителя. Поэтому сам пептид или белок может быть соединен с одной или более разными молекулами. Такое соединение представляет собой, например, ковалентное связывание с другой молекулой за счет боковой цепи аминокислоты. В качестве альтернативы пептид или белок могут быть соединены с другими элементами за счет нековалентного связывания, например, разных видов межмолекулярного притяжения, хемосорбции, разных видов электростатического притяжения и т. д. В других конкретных вариантах реализации настоящего изобретения пептидный или белковый носитель сам может выполнять одну или более дополнительных функций. Как правило, пептидный или белковый носитель может выполнять функцию антигена или может обладать функцией вакцины, например, презентировать экспонированный или поверхностный белок патогена, такого как бактерия, вирус, эукариотический паразит, или раковый антиген или аллерген.

[000195] В настоящей заявке термин «токсин-носитель» или «токсин», применительно к носителям, относится к токсичному соединению, которое обеспечивает по меньшей мере две функциональные активности (а) отравления, нарушения, уничтожения или повреждения биологического элемента, например, клетки или ткани, и (b) транспортировки груза, например, определенного в настоящей заявке. Чтобы функционировать как груз, токсин может быть связан, например, с помощью ковалентного или нековалентного связывания, с указанным грузом, например, антигеном, малой молекулой и т. д. Связывание оптимизировано так, что домен, ведущий к функциональной активности уничтожения, повреждения или отравления, не имеет препятствий или не подвергается отрицательному влиянию. Примеры токсинов для применения в отношении настоящего изобретения представляют собой малые молекулы, пептиды или белки. Эти соединения могут взаимодействовать с биологическими макромолекулами, такими как ферменты или клеточные рецепторы. Токсины могут сильно различаться по своей токсичности, которая варьируется от обычно незначительной токсичности, например, пчелиный токсин, до тяжелой токсичности в случае ботулотоксина. Предпочтительными токсинами-носителями согласно настоящему изобретению являются токсин холеры, энтеротоксин *E. coli*, токсин коклюша,

ботулотоксин, токсин *Clostridium botulinum* C2, токсин йота *Clostridium perfringens* или стрептолизин O.

[000196] Носитель также может представлять собой дендример. В настоящей заявке термин «дендример» относится к однотипно разветвленным молекулам, имеющим древовидную структуру. Дендримеры, как правило, характеризуются структурным совершенством и состоят из монодисперсных и симметричных сферических соединений. Считается, что дендримеры, как правило, состоят из трех основных частей: ядра, внутренней оболочки и внешней оболочки. Дендример может быть сконструирован, например, чтобы иметь отличающуюся функциональную активность в каждой из этих частей для контроля таких свойств как растворимость, термостабильность и присоединение соединений для конкретных вариантов применения. Дендримеры могут состоять из полиметилметакрилатного (ПММА), полистиролового, полиацетиленового, полифениленового, политиофенового, полифлуоренового, полифениленвиниленового, полифениленацетиленового, полисилоксанового, полиоксанорборненового, олигоспирокеталевого, полиглицеринового и полиэтилениминного (ПЭИ) остова, метильная группа которого замещена дендронной структурой. Особенно предпочтительными являются дендримеры ПММА. Полученные полимеры могут различаться по толщине и заряду, а также по массе, которая варьируется от низкомолекулярной до высокомолекулярной структуры. Дендримеры могут быть связаны или могут содержать элемент груза, который подлежит транспортировке. Например, груз может быть связан за счет ковалентного или нековалентного связывания с указанным грузом, например, антигеном, малой молекулой и т. д. Связывание может быть основано на образовании сложного эфира, амида, триазола, амина или простого эфира.

[000197] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения носитель может представлять собой фуллерен. В настоящей заявке термин «фуллерен» относится к молекуле из атомов углерода в форме полый сферы, эллипсоида или трубки, или любой другой подходящей полый формы. Подтип фуллеренов представляет собой бакминстер (buckminster)-фуллерен или бакибол (buckyball), который напоминает футбольный мяч и содержит пентагональные или гексагональные кольца. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения фуллерены могут содержать структуры C69, C79, C76, C82, C84, C86, C88, C90, C92, C94, C96, C98 или C100. Другой альтернативный вариант, который также предусмотрен согласно настоящему изобретению, представляет собой фуллерен на основе бора, например, со структурой B80. Также предусмотрены гетерофуллерены, содержащие, например, гетероатомы в некоторых положениях, такие как атомы бора, азота, кислорода или фосфора. Согласно другим вариантам реализации

настоящего изобретения фуллерены могут быть обеспечены в виде металлических фуллеренов, например, в виде графитовых стержней, легированных металлами или оксидами металлов, как правило, Sc, Y, La, рядом лантанидов или актиноидными элементами. Также предусмотрены металлофуллерены на базе триметаллических нитридов, кластерные фуллерены или триметасферы, которые содержат центральный атом азота (нитрид), связанный с тремя ионами металла. В типичных вариантах реализации фуллерены могут быть функционализированы или дериватизированы для повышения растворимости фуллеренов в органических средах или водных средах, например, путем циклопропирования, полигидроксилирования или циклоприсоединения азометиновых илидов. В конкретном варианте реализации фуллерен может быть дериватизирован свободными радикалами, что позволяет связывать активные формы кислорода и превращать фуллерен в высокоактивный антиоксидант. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фуллерен может транспортировать грузы в нековалентной ассоциации. Одна возможность заключается в том, что груз, например, белок, антитело, нуклеиновая кислота и т. д., ассоциирован с поверхностью фуллерена за счет супрамолекулярных взаимодействий или гидрофобных взаимодействий, электростатических взаимодействий и т. д. В случае транспорта груза нуклеиновой кислоты носитель предпочтительно может представлять собой эпоксидное производное н-тетра(пиперазино)фуллерена или циклопропанированный фуллерен C₆₀, например, нейтральными, катионными или анионными функциональными группами. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения могут быть обеспечены фуллерен-иммуноконъюгаты, в которых, например, присутствует дисульфидная связь между фуллереном и, например, антителом. В данном случае предпочтительным является применение малонодисериноламидного производного фуллерена C₆₀, которое может обеспечить нековалентное спонтанное связывание между антителом или белком и фуллереном. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения фуллерены можно применять в такой конфигурации и дериватизации, которая обеспечивает агрегацию в мицеллы, везикулы или липосомоподобные структуры на основе фуллерена. Эти структуры могут включать любую подходящую лекарственную молекулу в своем гидрофобном ядре. В еще одной группе вариантов реализации грузы могут быть ковалентно присоединены к фуллереновому носителю. Как правило, это может быть обеспечено с помощью дополнительного линкерного элемента между фуллереном и молекулой груза, которая присутствует на поверхности фуллерена. Это позволяет, в частности, отсрочить высвобождение груза. Также предусмотрены гликофуллерены, которые могут быть соединены с другими частицами за счет

образования триазольных связей. Более подробная информация может быть известна квалифицированному специалисту или может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Bolskar, 2016, Encyclopedia of Nanotechnology, Springer или Muñoz et al., 2016, Nature Chemistry, 8, 50–57.

[000198] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения носитель может иметь форму углеродной нанотрубки. В настоящей заявке термин «углеродная нанотрубка» относится к аллотропным формам углерода с цилиндрической наноструктурой. Эти цилиндрические углеродные молекулы, как правило, обладают нетипичными свойствами, которые можно применять для транспортировки груза и действий по доставке. Углеродные нанотрубки, как правило, показывают очень высокую прочность и жесткость. Как правило, они сконструированы с соотношением длины и диаметра до 132000000:1. Углеродные нанотрубки также, как правило, обладают высокой теплопроводностью. Как правило, они имеют длинную полую структуру со стенками, образованными, например, листами из атомов углерода толщиной в один атом, которые, как правило, называют графеном. Эти листы, как правило, прокатывают под определенными и дискретными углами, и комбинация угла прокатки и радиуса может определять свойства нанотрубок в отношении прочности, жесткости и т. д. Нанотрубки, как правило, классифицируют как одностенные нанотрубки (SWNT) и многостенные нанотрубки (MWNT), оба эти типа предусмотрены согласно настоящему изобретению. Нанотрубки также могут выстраиваться в веревочные структуры, которые, как предполагается, удерживаются вместе силами Ван-дер-Ваальса.

[000199] Обычно считается, что углеродные нанотрубки принадлежат к структурному семейству фуллеренов. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения углеродные нанотрубки могут быть модифицированы, как описано выше применительно к фуллеренам. Особенно предпочтительными являются связи между углеродными нанотрубками и нуклеиновыми кислотами, белками и пептидами. Также предусмотрены модификации с помощью свободных карбоновых кислот, которые могут быть соединены с другими частицами за счет образования сложноэфирных или аминных связей.

[000200] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения носитель, определенный в настоящей заявке выше, можно применять с грузом или без него. Если носитель применяется без груза, он сам может обеспечивать функциональную активность, описанную в настоящей заявке. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения носитель содержит груз или ассоциирован с ним. Форма, в которой груз соединен с носителем, может зависеть от формы/характера носителя, а также

от формы/характера груза. В некоторых случаях может быть предусмотрена ковалентная связь, в то время как в других случаях можно применять электростатическую связь. Согласно некоторым другим вариантам реализации настоящего изобретения ассоциация может быть основана на встраивании элементов груза в липосоме или аналогичной структуре. Например, груз может быть расположен внутри носителя и/или может быть связан с внешней стороной носителя и/или может быть интегрирован в моно- или двухслойную структуру носителя, например, липосомы, упомянутой в настоящей заявке выше.

[000201] В настоящей заявке термин «груз» относится к любому подходящему веществу, соединению или элементу, который расположен внутри носителя, определенного выше, и/или связан или ассоциирован с внешней стороной, например, поверхностью, носителя и/или интегрирован в однослойную или двухслойную структуру носителя, например, в случае если носитель представляет собой частицу, содержащую мембрану или бислой, такую как липосома, и должен транспортироваться во внутреннее содержимое клетки, в конкретный компартмент клетки, например, в эндосому, или к поверхности или окружению клетки. Предпочтительно груз выгружается во внутреннее содержимое клетки. Предпочтительно груз обеспечивает или опосредует благоприятный эффект на клетку, ткань, содержащую клетку, или организм, содержащий клетку, в медицинской ситуации. Примеры таких благоприятных эффектов представляют собой терапевтическую активность/возможности, диагностическую активность/возможности после доставки к клетке или внутрь нее. Это может быть выполнено *in vivo*, но также, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, *ex vivo*, например, в окружении *in vitro*, как правило, с вариантом повторного введения в организм впоследствии, например, с помощью повторной имплантации клеток. «Терапевтическая активность» может включать лечение, улучшение и/или профилактику/избегание заболевания или медицинского состояния. Термин «диагностическая активность» может включать визуализацию, детектирование, установление различия и/или идентификацию патологического/медицинского состояния и соотнесение отклонения с клинической картиной.

[000202] Предпочтительно «груз» относится, но не ограничивается ими, к малой молекуле, пептиду, белку, цитотоксическому веществу, нуклеиновой кислоте, окрашивающему веществу, пигменту, красителю, металлу, радионуклиду, вирусу, модифицированному вирусу, вирусному вектору, инокулянту, плазмиде и/или многокомпонентной системе.

[000203] В настоящей заявке «пептид» или «белок», применительно к грузу, представляет собой пептид, определенный в настоящей заявке выше, или белок, определенный в настоящей заявке выше. Предпочтительно такой пептид или белок выполняет некоторую функцию для клетки, к которой транспортируется груз, или организма, который содержит указанную клетку. Такая функция может представлять собой терапевтическую или диагностическую функцию. Пептид или белок могут происходить из любой подходящей категории. Например, он может представлять собой антигенный элемент, антитело, фермент, аллерген, токсин, каталитическую частицу, рецептор и т. д. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения белок как часть груза в соответствии с настоящим изобретением может быть выбран из группы, содержащей: терапевтические белки, белки «самоубийства», белки-супрессоры опухолей, факторы транскрипции, ингибиторы киназ, киназы, регуляторные белки, апоптотические белки, антиапоптотические белки, микробные антигены, вирусные антигены, бактериальные антигены, паразитарные антигены, клеточные антигены, раковые антигены, факторы дифференцировки, факторы иммортализации, белковый/пептидный токсин, ферменты, пептидные/белковые гормоны, пептидные/белковые молекулы адгезии, рецепторные молекулы, пептидные ингибиторы или пептидные/белковые агенты против старения.

[000204] В настоящей заявке термин «терапевтический белок», применительно к грузу, относится к любому белку, который оказывает терапевтический эффект на организм животного, в частности, на организм человека, как известно квалифицированному специалисту в данной области техники. Как правило, термин относится к терапевтическому ферменту. Примерами таких ферментов являются альглоцераза, которую можно применять в лечении дефицита лизосомальной глюкоцереброзидазы (болезнь Гоше), альфа-L-идуронидаза, которую можно применять в лечении мукополисахаридоза I, или аденозиндезаминаза, которую можно применять в лечении синдрома тяжелого комбинированного иммунодефицита.

[000205] В настоящей заявке термин «белок «самоубийства», применительно к грузу, относится к любому белку, который приводит к разрушению клетки из-за действия белка, как правило, в результате ферментативной реакции в присутствии соответствующего субстрата. Примерами таких белков являются нуклеозидкиназы, такие как HSV-1 ТК, или мультисубстратная дезоксирибонуклеозидкиназа Dm-dNK.

[000206] В настоящей заявке термин «белок-супрессор опухоли», применительно к грузу, относится к любому белку, который защищает клетку от одного этапа на пути к раку. Предпочтительно термин относится к любому такому белку, известному

квалифицированному специалисту в данной области техники. Более предпочтительно термин относится к белку Rb, супрессору опухоли p53, APC и CD95.

[000207] В настоящей заявке термин «фактор транскрипции», применительно к грузу, относится к любому белку, который связывается с конкретными частями ДНК с применением ДНК-связывающих доменов и который является частью системы, которая контролирует транскрипцию генетической информации с ДНК в РНК, как известно квалифицированному специалисту в данной области техники. Предпочтительно термин относится к TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH и TATA-связывающему белку (TBP).

[000208] В настоящей заявке термин «ингибиторы киназ», применительно к грузу, относится к любому белку, который представляет собой тип ингибитора фермента, который специфично блокирует действие протеинкиназы. Предпочтительно термин относится к эрбитуксу (цетуксимабу) и герцептину. Безусловно, согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение небелковых ингибиторов киназ, которые могут представлять собой, например, небольшие органические молекулы, определенные в настоящей заявке.

[000209] В настоящей заявке термин «киназа», применительно к грузу, относится к любому белку, который переносит фосфатные группы от высокоэнергетических донорных молекул, таких как АТФ, к конкретным молекулам-мишеням. Предпочтительно термин относится к тирозинкиназе или MAP-киназе, MEK1 или MEK2.

[000210] В настоящей заявке термин «апоптотический белок», применительно к грузу, относится к любому белку, который приводит к запрограммированной гибели клеток в многоклеточных организмах. Более предпочтительно термин относится к проапоптотическому белку BAX, BID, BAK или BAD.

[000211] В настоящей заявке термин «антиапоптотический белок», применительно к грузу, относится к любому белку, который препятствует запрограммированной гибели клеток в многоклеточных организмах. Предпочтительно термин относится к антиапоптотическому белку, подобному Bcl-XI, Bcl-2, и другим членам семейства Bcl-2.

[000212] Термины «микробные антигены», «вирусные антигены», «бактериальные антигены», «паразитарные антигены» и «клеточные антигены», применительно к молекулам груза, относятся к иммуногенам, которые способны стимулировать иммунный ответ, происходящим из микробов, вирусов, бактерий, паразитов или клеток, соответственно, в частности, как определено в настоящей заявке ниже.

[000213] В настоящей заявке «фактор дифференциации», применительно к грузу, относится к любому фактору, который функционирует преимущественно в процессе развития и приводит к дифференцировке тканей, групп конкретных клеток.

Предпочтительно термин относится к факторам роста и дифференциации (GDF), таким как GDF1, GDF2, GDF3, GDF5, GDF6, GDF8, GDF9, GDF10, GDF11 и GDF15.

[000214] В настоящей заявке термин «факторы иммортализации», применительно к грузу, относится к любому фактору, который вызывает отсутствие длительного повышения уровня смертности клетки в зависимости от хронологического возраста. Предпочтительно термин относится к любому такому фактору, известному квалифицированному специалисту в данной области техники. Более предпочтительно термин относится к теломеразе или большому Т-антигену.

[000215] В настоящей заявке термин «пептидный/белковый гормон», применительно к грузу, относится к любому соединению, которое переносит в качестве мессенджера сигнал от одной клетки (или группы клеток) к другой за счет крови. Более предпочтительно термин относится к простагландину, серотонину, гистамину, брадикинину, каллидину и гормонам желудочно-кишечного тракта, высвобождающим гормонам, гормонам гипофиза, инсулину, вазопрессину (ADH), глюкагону, энкефалину, кальцитонину, кортикостероидам, кортикотропин-высвобождающему гормону (CGRI), веществу P, GRP, MSH и нейромедиаторам.

[000216] В настоящей заявке термин «пептидная/белковая молекула адгезии», применительно к грузу, относится к пептидам или белкам на поверхности клетки, участвующим в связывании с другими клетками или с внеклеточным матриксом (ВКМ) в процессе клеточной адгезии. Предпочтительно термин относится к любой такой молекуле, известной квалифицированному специалисту в данной области техники. Более предпочтительно термин относится к IgSF CAM, таким как NCAM, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, L1, CHL1, MAG, интегринам или селектинам.

[000217] В настоящей заявке термин «рецепторные молекулы», применительно к грузу, относится к белку на клеточной мембране или внутри цитоплазмы или ядра клетки, который связывается с лигандом и, как правило, передает сигнал. Предпочтительно термин относится к метаботропным рецепторам, рецепторам, сопряженным с G-белком, мускариновым рецепторам ацетилхолина, рецепторам аденозина, адренорецепторам, рецепторам ГАМК, рецепторам ангиотензина, рецепторам каннабиноидов, рецепторам холецистокинина, рецепторам дофамина, рецепторам глюкагона, метаботропным рецепторам глутамата, рецепторам гистамина, обонятельным рецепторам, опиоидным рецепторам, хемокиновым рецепторам, чувствительному к кальцию рецептору, рецепторам соматостатина, рецепторам серотонина или рецепторам секретина.

[000218] В настоящей заявке термин «пептидные ингибиторы», применительно к грузу, относится к пептидам, которые оказывают ингибирующий эффект на

физиологические функции, предпочтительно на функцию белка, сходную с ферментативными функциями.

[000219] В настоящей заявке термин «белковый/пептидный агент против старения», применительно к грузу, относится к любому соединению, которое предотвращает, замедляет или обращает эффекты старения. Предпочтительно термин относится к гормону роста человека (HGH).

[000220] В настоящей заявке термин «цитотоксическое вещество» в целом относится к любому соединению, которое токсично для живой клетки, в частности, для клетки высших эукариотов, более конкретно для клетки млекопитающего или человека. В результате действия цитотоксического вещества клетка может подвергнуться некрозу, в клетке может остановиться ростовая активность или пролиферация, или клетка может подвергнуться программе апоптоза. Как правило, клетки, подвергающиеся некрозу, проявляют быстрое набухание, теряют целостность мембраны, снижают свой метаболизм и высвобождают содержимое в окружающую среду. Напротив, апоптоз характеризуется определенными цитологическими и молекулярными событиями, включая изменение показателя преломления клетки, сжатие цитоплазмы, ядерную конденсацию и расщепление ДНК на фрагменты одинакового размера. Цитотоксичность можно измерить в соответствии с подходящими анализами, например, путем измерения целостности клеточной мембраны. В случае лечения рака цитотоксическое вещество может представлять собой химиотерапевтическое соединение. В качестве альтернативы цитотоксическое вещество также может представлять собой антитело, которое обеспечивает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), при которой клетки уничтожаются лимфоцитами, которые были связаны антителом. Примеры цитотоксических лимфоцитов включают цитотоксические Т-клетки и природные клетки-киллеры.

[000221] В настоящей заявке термин «химиотерапевтическое соединение», применительно к грузу, относится к соединениям из нескольких различных функциональных классов, которые применяют для терапевтического лечения раковых клеток. Соединения могут представлять собой, например, алкилирующие агенты, антрациклины, разрушители цитоскелета (таксаны), эпотилоны, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы топоизомеразы I и II, ингибиторы киназ, аналоги нуклеотидов или аналоги предшественников, пептидные антибиотики, агенты на основе платины, ретиноиды, алкалоиды барвинка и их производные. Предусмотренный в настоящей заявке пример алкилирующего агента представляет собой циклофосфамид, который представляет собой фосфоамидный метаболит иприта, образующийся в клетках,

содержащих низкий уровень ALDH (альдегиддегидрогеназы), например, в стволовых клетках печени, кишечника, костного мозга. Метаболит, как правило, сшивает ДНК у положения N-7 гуанина, что, как предполагается, приводит к апоптозу клеток. Другим примером является мехлорэтамин, который, как правило, сшивает ДНК у положения N-7 гуанина и тем самым предотвращает дубликацию клеток, что приводит к апоптозу клеток. Другим примером является хлорамбуцил, который стимулирует алкилирование нуклеиновой кислоты и перекрестно сшивает ДНК, что приводит к остановке клеточного цикла. Это соединение может быть детоксифицировано глутатионтрансферазой Р1 человека (GST P1-1), которая часто гиперэкспрессирована в раковой ткани. Другими примерами являются нитрозомочевины, которые представляют собой липофильные ДНК-алкилирующие агенты и способны за счет этого пересекать гематоэнцефалический барьер. Также предусмотрен темозоломид, который стимулирует алкилирование/метилование ДНК у положения O-6/n-7 гуанина. Кроме того, его можно применять в качестве пролекарства в форме имидазотетразинового производного. O-6-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза, кодируемая как O-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, может предотвратить повреждение клеток. Предусмотренные в настоящей заявке примеры антрациклинов включают даунорубин, доксорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон, пиксантрон, лозоксантрон, сабарубин (который представляет собой дисахаридный аналог доксорубина) и валрубин (который представляет собой полусинтетический аналог доксорубина). Эти соединения, как правило, действуют как интеркаляторы ДНК и таким образом ингибируют, например, топоизомеразу II. Предусмотренные в настоящей заявке примеры разрушителей цитоскелета (таксанов) включают паклитаксел, доцетаксел, абраксан и таксотер. Эти соединения, как правило, нацелены на тубулин, в частности, за счет связывания субъединицы гетеродимера α -тубулина, что приводит к дефектам сборки митотического веретена, сегрегации хромосом и деления клеток. Предусмотренные в настоящей заявке примеры эпотилонов включают эпотилон А-Е. Другими примерами являются иксабепилон, патупилон и утиделон. Эти соединения приводят к нарушению тубулина. Они обладают лучшей растворимостью в воде, чем сходные с паклитакселом соединения, что может привести к повышенной эффективности. Предусмотренные в настоящей заявке примеры ингибиторов гистондеацетилазы включают вориностат и ромидеписин. Эти соединения, как правило, связываются с цинк-зависимыми активными сайтами и действуют как хелаторы для ионов цинка, что приводит к накоплению ацетилированных белков, в частности, гистонов. Предусмотренные в настоящей заявке примеры ингибиторов топоизомеразы I включают иринотекан. Иринотекан связывается с топоизомеразой I и образует тройной комплекс

ДНК, который предотвращает повторное лигирование ДНК и вызывает повреждение ДНК. Другие примеры включают топотекан. Силатекан, коситекан, экзатекан, луртотекан, гиматекан, белотекан и рубитекан, которые представляют собой полусинтетические производные кампотецина. Предусмотренные в настоящей заявке примеры ингибиторов топоизомеразы II включают этопозид, который образует тройной комплекс с ДНК и ферментом топоизомеразой II, предотвращая повторное лигирование ДНК. Также предусмотрен тенипозид, который стабилизирует промежуточные соединения топоизомеразы II-ДНК и индуцирует разрывы двухцепочечной ДНК. Другим примером является тафлупозид. Предусмотренные в настоящей заявке примеры ингибиторов киназ включают бортезомиб, который является ингибитором протеасомы, в котором атом бора связывает каталитический сайт 26S протеасомы. Другие примеры включают эрлотиниб и gefitinib, которые ингибируют тирозинкиназу EGFR путем обратимого связывания с сайтом связывания АТФ и тем самым предотвращают сигнальный каскад. Также предусмотрено применение вемурафениба, который приводит к прерыванию пути V-Raf/MEK/ERK, если V-Raf имеет мутацию V600E. Также предусмотрен иматиниб, который является ингибитором ряда тирозинкиназных ферментов. Как правило, он занимает активные сайты ТК для уменьшения активности bcr-abl, например, при хроническом миелогенном лейкозе, когда происходит гибридизация abl с bcr. Также предусмотрен висмодегиб, который представляет собой конкурирующий с циклопамином антагонист smoothed-рецептора (SMO, часть сигнального пути hedgehog). В частности, его можно применять для лечения базальноклеточной карциномы. Предусмотренные в настоящей заявке примеры аналогов нуклеотидов или аналогов предшественников включают азациитидин (который является аналогом нуклеозида цитидина и в низких концентрациях вызывает гипометилирование, а в высоких концентрациях может приводить к цитотоксичности), азатиоприн (который ингибирует синтез пурина), капецитабин, цитарабин (который сочетает в себе цитозиновое основание с сахаром арабинозой и представляет собой антиметаболический агент; он действует за счет включения в ДНК вместо цитозиндезоксирибозы человека и, как правило, вызывает гибель клеток), доксифлуридин (который является метаболитом капецитабина), фторурацил (который является ингибитором тимидилатсинтазы, блокируя синтез пиримидинового нуклеозида тимидина), гемцитабин (который, как правило, интегрируется в цепь ДНК в качестве цитидина, что приводит к невозстановливаемым ошибкам и гибели клеток), гидроксимочевину (которая является ингибитором рибонуклеотидредуктазы, связывая свободные радикалы тирозила, и, как правило, уменьшает выработку дезоксирибонуклеотидов), меркаптопурин (который ингибирует

ксантинооксидазу), метотрексат (который ингибирует синтез ДНК, РНК, тимидилатов и белков) и тиогуанин (который является аналогом гуанина и приводит к ингибированию синтеза гуаниновых нуклеотидов). Предусмотренные в настоящей заявке примеры пептидных антибиотиков включают блеомицин (который приводит к индукции разрывов цепи ДНК) и актиномицин (который связывает ДНК в комплексе инициации транскрипции и тем самым предотвращает удлинение РНК). Предусмотренные в настоящей заявке примеры агентов на основе платины включают карбоплатин, цисплатин (который препятствует репликации ДНК путем связывания и сшивания ДНК) и оксалиплатин (который препятствует репликации ДНК путем связывания и сшивания ДНК). Предусмотренные в настоящей заявке примеры ретиноидов включают третиноин (который, как было показано, усиливает дифференцировку клеток острого промиелоцитарного лейкоза и останавливает пролиферацию), алитретиноин (который, как предполагается, является эндогенным лигандом ретиноидного рецептора X) и бексаротен (который активирует ретиноидные рецепторы X и индуцирует дифференцировку клеток и апоптоз). Предусмотренные в настоящей заявке примеры алкалоидов барвинка и их производных включают винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин, которые, как предполагается, действуют как ингибиторы микротрубочек.

[000222] Согласно настоящему изобретению, в другом варианте реализации настоящего изобретения, в частности, предусмотрено применение альфа-амантина и его аналогов или производных в качестве токсичного вещества. Эти соединения частично (partially) ингибируют РНК-полимеразу II и III. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения альфа-амантин или его аналоги или производные могут быть связаны с белком или пептидом и могут транспортироваться в этой форме в качестве груза к целевой конечной точке, т. е. к клетке или ткани.

[000223] В соответствии с их механизмом действия токсичные вещества, охарактеризованные выше, можно применять для внутриклеточного или внеклеточного введения. Соответственно, они могут быть обеспечены в транспортирующих системах, которые доставляют груз внутриклеточно, как определено в настоящей заявке, или которые доставляют груз внеклеточно, как определено в настоящей заявке.

[000224] В настоящей заявке термин «малая молекула», применительно к грузу, относится к молекулам, например, органическим молекулам, которые являются терапевтически пригодными и предпочтительно включают лекарственные средства или другие биологически, терапевтически или диагностически активные агенты, которые действуют для обеспечения правильного функционирования клетки, или к молекулам, которые могут индуцировать, например, апоптоз или лизис клетки, если целевой является

гибель клетки, такой как раковая клетка или аберрантная клетка, или которые индуцируют иммунологические реакции, или которые обеспечивают разные виды маркерной функциональной активности. Малая молекула, как правило, имеет низкую молекулярную массу менее 900 Да. Как правило, малые молекулы с молекулярной массой приблизительно 900 Да или меньше, как предполагается, способны быстро диффундировать через клеточные мембраны. Соответственно, малые молекулы могут быть обеспечены в виде грузов, которые будут доставлены внутриклеточно и/или внеклеточно. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения малая молекула может иметь слабую растворимость в водных жидкостях, таких как сыворотка и водный солевой раствор. Таким образом, соединения, терапевтическая эффективность которых ограничена их низкой растворимостью, могут быть введены в более высоких дозировках в соответствии с настоящим изобретением и могут быть более эффективными на молярной основе благодаря более высоким уровням поглощения клетками. Аналогичным образом, соединения могут быть эффективными уже в низких или очень низких концентрациях. Таким образом, специфичное нацеливание этих соединений в качестве грузов в соответствии с настоящим изобретением на конкретные клетки позволяет избежать системного и довольно неспецифичного введения и тем самым позволяет снизить общее количество соединения, которое будет введено. Примеры предусмотренных малых молекул, которые будут транспортироваться в качестве грузов в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, противовирусные агенты, антипролиферативные агенты, цитостатики, иммуноподавляющие агенты, антагонисты гистаминовых рецепторов, витамины, обезболивающие агенты, противоопухолевые агенты, противовоспалительные агенты, терапевтические органические молекулы, ингибиторы, например, ингибитор фермента, например, ингибиторы киназ, и т. п. Предусмотренные в настоящей заявке примеры антибактериальных агентов включают аминогликозиды, такие как неомицин или гентамицин, полимиксин, хлорамфеникол, бацитрацин, фрамицетин, энрофлоксацин, марбофлоксацин, миконазол, сульфадiazин серебра, повидон-йод, хлоргексидин и уксусную кислоту. Предусмотренные в настоящей заявке примеры противогрибковых агентов включают полиеновые противогрибковые агенты, такие как амфотерицин В, кандицидин или хамацин и т. д.; имидазолы, такие как бифоназол, бутконазол или клотримазол и т. д.; триазолы, такие как альбаконазол, эфинаконазол или эпоксиконазол и т. д.; тиазолы, такие как абафунгин; аллиламины и эхинокандины. Предусмотренные в настоящей заявке примеры противовирусных агентов включают амантадин, римантадин, плеконарил, ацикловир, зидовудин, ламивудин (который является

ингибитором обратной транскрипции) и рифампицин (который является ингибитором сборки). Предусмотренные в настоящей заявке примеры цитостатиков включают алкилирующий агент, например, определенный в настоящей заявке выше; антиметаболиты, такие как метотрексат, азотиоприн, меркаптопурин или фторурацил, определенные в настоящей заявке выше. Предусмотренные в настоящей заявке примеры иммуноподавляющих агентов включают глюкокортикоиды, такие как преднизон, дексаметазон, гидрокортизон; цитостатики; антитела; лекарственные средства, действующие на иммунофилины, такие как циклоспорин, такролимус, сиролимус или эверолимус; а также интерфероны, опиоиды, белки, связывающие TNF-альфа, микофенолат, финголимод и мириоцин. Предусмотренные в настоящей заявке примеры антагонистов гистаминовых рецепторов включают циметидин, ранитидин, фамотидин и зизатидин. Предусмотренные в настоящей заявке примеры обезболивающих агентов включают парацетамол, фенацетин, аспирин, ибупрофен, напроксен и опиоиды, такие как морфин. Предусмотренные в настоящей заявке примеры противоопухолевых агентов включают аналоги нуклеозидов, антифолаты, ингибиторы топоизомеразы I, антрациклины, подофиллотоксины, таксаны, алкалоиды барвинка, алкилирующие агенты, соединения платины, ингибиторы тирозинкиназ, ингибиторы mTOR, ретиноиды, иммуномодулирующие агенты и ингибиторы гистондеацетилазы, например, определенные в настоящей заявке выше. Предусмотренные в настоящей заявке примеры противовоспалительных агентов включают антитела к интерлейкину, резолвины, глюкокортикоиды, ингибиторы протеаз, статины, ингибиторы гистондеацетилазы, агонисты простагландина, ингибиторы фосфодиэстеразы-4, агонисты рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, ингибиторы системы комплемента, антикоагулянты и тромболитики.

[000225] В настоящей заявке термин «нуклеиновая кислота», применительно к грузу, относится к любой нуклеиновой кислоте, известной квалифицированному специалисту в данной области техники, например, к полинуклеотиду, подобному ДНК, РНК, одноцепочечной ДНК, кДНК или их производным. Предпочтительно термин относится к олигонуклеотидам и полинуклеотидам, образованным из ДНК и РНК, и их аналогам, которые имеют отобранные последовательности, сконструированные для гибридизации с комплементарными мишенями, такие как антисмысловые последовательности для одноцепочечных или двухцепочечных мишеней, или для экспрессии транскриптов нуклеиновых кислот или белков, кодируемых последовательностями. ДНК может быть обеспечена, например, в форме А-ДНК, В-ДНК или Z-ДНК. Аналоги включают заряженные и предпочтительно незаряженные аналоги остова, такие как фосфонаты,

метилфосфонаты, фосфоамидаты, предпочтительно N-3' или N-5', тиофосфаты, незаряженные полимеры на основе морфолиногруппы, ПНК или CNA, HNA, LNA или ANA. Такие молекулы можно применять в различных терапевтических схемах, включая, например, заместительную ферментную терапию, генную терапию или антисмысловую терапию. РНК может быть в форме, например, п-РНК, т. е. пиранозил-РНК, или структурно модифицированных форм, таких как шпилечная РНК или РНК типа «петля-на-стебле». Кроме того, термин относится к антисмысловой РНК. Белок, РНК или рибосома, кодируемые нуклеиновой кислотой, например, могут быть недостаточно представленными, недействующими или могут не существовать в клетке, и антисмысловая РНК, кодируемая нуклеиновой кислотой, может обеспечить устранение нежелательной функции молекулы. В настоящей заявке термин «ПНК» относится к пептидной нуклеиновой кислоте, т. е. к искусственно синтезированному полимеру, сходному с ДНК или РНК, которая применяется в биологических исследованиях и медицинских процедурах, но которая, как известно, не встречается в природе. Остов ПНК, как правило, состоит из повторяющихся звеньев N-2-аминоэтилглицина, связанных пептидными связями. Различные пуриновые и пиримидиновые основания связаны с остовом метилен-карбонильными связями. ПНК обычно изображают как пептиды с N-концом в первом (левом) положении и C-концом в правом. В настоящей заявке термин «CNA» относится к нуклеиновой кислоте на основе аминоклогексилэтановой кислоты. Кроме того, термин относится к циклопентановой нуклеиновой кислоте, т. е. к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей, например, 2'-дезоксикарбагуанозин. В настоящей заявке термин «HNA» относится к нуклеиновым кислотам на основе гексита, т. е. аналогам ДНК, которые построены из стандартных нуклеиновых оснований и фосфорилированного 1,5-ангидрогекситового остова. В настоящей заявке термин «LNA» относится к запертым нуклеиновым кислотам. Как правило, запертая нуклеиновая кислота представляет собой модифицированный и, следовательно, недоступный нуклеотид РНК. Рибозная группа нуклеотида LNA может быть модифицирована с применением дополнительного мостика, соединяющего 2' и 4' атомы углерода. Такой мостик запирает рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Запертая конформация рибозы улучшает послоную упаковку оснований и предварительную организацию остова. Это может значительно повысить термостабильность, т. е. температуру плавления олигонуклеотида. В настоящей заявке термин «ANA» относится к арабино-нуклеиновым кислотам или их производным. Предпочтительным производным ANA применительно к настоящему изобретению является 2'-деокси-2'-фтор-бета-D-арабинонуклеозид (2'F-ANA). Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения молекулы

нуклеиновой кислоты могут содержать комбинацию любой из одноцепочечной ДНК, РНК, ПНК, СНА, ННА, LNA и ANA. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, определенная выше, кодирует белок или пептид, представляющий интерес, например, терапевтический белок или иммунологически активный белок, или диагностически детектируемый белок, например, биолюминесцентный белок, т. е. белок или пептид, который предназначен для доставки к клетке-мишени, т. е. лангерин⁺ клетке. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения такие белки могут представлять собой раковые антигены или токсичные белки и т. д., определенные в настоящей заявке ниже. Соответственно, нуклеиновая кислота обеспечивает элементы, обеспечивающие экспрессию кодируемых белков в клеточном окружении, такие как промотор, терминатор, оба функционально связанные с геном, или элементы, обеспечивающие интеграцию в геном клетки, или элементы, обеспечивающие постоянное или кратковременное присутствие в ядре, например, в виде внехромосомной частицы. Например, нуклеиновая кислота может быть обеспечена в форме плазмиды, определенной в настоящей заявке ниже.

[000226] В настоящей заявке термин «окрашивающее вещество», применительно к грузу, относится к любому подходящему молекулярному окрашивающему агенту, который обеспечивает по меньшей мере функциональную активность окрашивания или выделения цветом биологического элемента, например, клетки или ткани. Окрашивающее вещество может быть соединено со транспортирующей структурой, определенной в настоящей заявке, например, наночастицей. Окрашивающее вещество, например, может быть связано, например, с помощью ковалентного или нековалентного связывания, с указанным носителем, или может транспортироваться как груз, например, в липосомных носителях, или может быть соединено с другим грузом, таким как антиген, малая молекула и т. д. Связывание может быть оптимизировано так, что хромофор, приводящий к функциональной активности окрашивания или выделения цветом, не имеет препятствий или не подвергается отрицательному влиянию. Как правило, окрашивающее вещество может действовать как пигмент или краситель, в зависимости от используемого средства для переноса. Предпочтительно окрашивающее вещество представляет собой краситель.

[000227] В настоящей заявке термин «пигмент», применительно к грузу, относится к любому материалу, который изменяет цвет отраженного или проходящего света в результате поглощения определенной длины волны. Этот физический процесс отличается от флуоресценции, фосфоресценции и других форм люминесценции, при которых материал излучает свет. Пигменты, как правило, нерастворимы в воде. В одном примере

пигмент может представлять собой неорганическое вещество. В качестве альтернативы пигмент также может иметь органическую природу. Как правило, пигмент может быть нерастворим в водных жидкостях. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения пигмент может иметь размер более 1 мкм. Примерами подходящих пигментов являются пигменты на основе гема или порфирина, такие как хлорофилл, билирубин, гемоцианин, гемоглобин, миоглобин, каротиноиды, гематохромы, каротины, такие как альфа- и бета-каротин, ликопин или родопсин, ксантофиллы, такие как кантаксантин, зеаксантин или лютеин, фитохром, фикобилипротеины, полиеновые еноляты, меланин, урохром, флавоноиды.

[000228] В настоящей заявке термин «краситель», применительно к грузу, относится к окрашенному веществу, которое поглощает некоторые определенные длины волн видимого света, которое, как правило, применяется в водном растворе. В типичном примере краситель представляет собой нерастворимую в воде малую молекулу. Примерами подходящих красителей являются акридиновые красители, антрахиноновые красители, арилметановые красители, такие как диарилметановые красители, триарилметановые красители, азокрасители, diaзониевые красители, нитрокрасители на основе функциональной нитрогруппы, нитрозокрасители на основе функциональной нитрозогруппы, фталоцианиновые красители, хинониминные красители, такие как эйродиновые красители или сафраниновые красители, индамины, индофенольные красители, оксазоновые красители, тиазиновые красители, тиазоловые красители, ксантеновые красители, флуореновые красители, пирониновые красители, флуореновые красители или родаминовые красители. Особенно предпочтительными являются флуоресцеин, родамин, фикоэритрин, флуорескамин и родопсин.

[000229] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения также предусмотрено применение дополнительных соединений, обеспечивающих окраску (например, в качестве груза, который будет транспортирован к клетке/в клетку), таких как хемилюминесцентные соединения, например, люминал, имидазол, биолюминесцентные белки, например, люциферин, люцифераза, зеленый флуоресцентный белок (GFP), mCherry, mOrange, TagBFP, Cerulean, Citrine, mTurquoise, красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и их производные, такие как EGFP, ECFP, BFP, EBFP, EBFP2 или BFP. Другие соединения, обеспечивающие окраску, которые можно применять в отношении настоящего изобретения, включают 6-FAM, HEX, TET, ROX, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, тexasский красный или родамин, PerCP, Pacific Blue, APC, Alexa 405, 430, 488, 546, 559, 594, 633, 660, 674, 680, 700, Cascade Blue, TAMRA, Dabcyl, тушитель «Черная дыра», BHQ-1 или BHQ-2.

[000230] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения этот термин также распространяется на визуализирующие агенты. Примерами таких визуализирующих агентов являются агенты для диагностической визуализации или контрастирования. Предусмотрены, например, агенты ближнего инфракрасного диапазона и фотоакустические агенты, например, для вариантов применения *in vivo*.

[000231] В настоящей заявке термин «металл», применительно к грузу, относится к любому металлу, известному квалифицированному специалисту в данной области техники. Предпочтительно термин относится к золоту, платине, осмию, серебру, железу, лантаноидным металлам или актиноидным металлам. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин также относится к радиоактивному металлу.

[000232] В настоящей заявке термин «радионуклид», применительно к грузу, относится к радиоактивному нуклиду или радиоактивному изотопу с избытком ядерной энергии, что делает его нестабильным. Радионуклиды могут представлять собой либо альфа-излучающие радионуклиды, бета-излучающие радионуклиды, либо радионуклиды, излучающие электроны Оже. Примеры подходящих радионуклидов включают H^3 , C^{14} , P^{32} , P^{33} , S^{35} , I^{125} , C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} , Cu^{64} , Cu^{67} , Sr^{89} , Tc^{99} , mTc^{99} , Sm^{153} , I^{123} , I^{125} , I^{129} , I^{131} , Br^{77} , Rb^{82} , Ga^{68} или F^{18} , Y^{90} , Lu^{177} , Ho^{166} , Re^{186} , Re^{188} , Pm^{149} , Au^{199} и Rh^{105} . Радионуклиды также могут быть изготовлены в подходящих композициях или могут быть связаны с дополнительными молекулами или носителями.

[000233] В настоящей заявке термин «вирус», применительно к грузу, относится к любому типу вируса, известному квалифицированному специалисту в данной области техники. Предпочтительно вирус выбран из группы, состоящей из аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, вируса простого герпеса, лентивирусов и ретровирусов. В настоящей заявке термин, согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, относится к вирусу, который способен вызывать иммунологический ответ, например, в форме вакцины.

[000234] В настоящей заявке термин «модифицированный вирус», применительно к грузу, относится к молекуле вируса, которая была изменена по сравнению с вирусом дикого типа. Такая модификация предпочтительно может приводить к уменьшению жизнеспособности или может влиять на возможности связывания или взаимодействия вируса, как будет известно квалифицированному специалисту в данной области техники. Типичным примером модифицированного вируса является ослабленный вирус, обеспеченный в вакцине.

[000235] В настоящей заявке термин «вирусный вектор», применительно к грузу, относится к генетическим элементам, происходящим из вирусов, которые

модифицированы таким образом, чтобы минимизировать риск при обращении с ними. Предпочтительно термин относится к любому такому элементу, известному квалифицированному специалисту в данной области техники. Как правило, в вирусных векторах удалена часть вирусного генома, имеющая решающее значение для репликации вируса. Предпочтительно такой вирус может эффективно инфицировать клетки, но после инфицирования необходимо, чтобы вспомогательный вирус обеспечивал недостающие белки для выработки новых вирионов. Кроме того, вирусные векторы, как правило, обладают низкой токсичностью, генетически стабильны и не перегруппировывают свои геномы. Более предпочтительно термин относится к вирусным генетическим элементам в соответствии с приведенным выше определением, происходящим из аденовирусов, аденоассоциированных вирусов или ретровирусов. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения вирусный вектор представляет собой вирусный вектор для вакцин. Такие векторы обычно считаются безопасными и, как правило, проявляют ослабление и устранение соответствующих видов функциональной активности. Подходящими примерами таких вирусных векторов являются вирус осповакцины, вирус оспы птиц, вирус кори, аденовирус, ALVAC, MVA, поксвирус. Особенно предпочтительным является MVA (модифицированная вакцина Анкара).

[000236] В настоящей заявке термин «инокулянт», применительно к грузу, относится к соединению или композиции, которая обеспечивает приобретенный иммунитет к конкретному заболеванию. Инокулянт может представлять собой, например, агент, который сходен с вызывающим заболевание элементом, но ослаблен или обеспечен в убитой или неинфекционной форме. Также включены токсины микроорганизмов или их части, поверхностные элементы, такие как белки или гликопротеины, или молекулы сахара, присутствующие на поверхности вызывающего заболевание элемента. Кроме того, инокулянт может содержать или может представлять собой антиген или эпитоп антигена причинного элемента, такой как раковый антиген, определенный в настоящей заявке, бактериальный антиген, определенный в настоящей заявке, вирусный антиген, определенный в настоящей заявке, антиген аутоиммунного заболевания, определенный в настоящей заявке, или аллерген, определенный в настоящей заявке. Инокулянт также может быть обеспечен в форме белка или пептида, или в виде способной к экспрессии нуклеиновой кислоты, или в виде любого другого подходящего соединения, известного квалифицированному специалисту. Также предусмотрено применение подходящих комбинаций более чем одного инокулянта, комбинации более чем одного типа инокулянта, например, белка и нуклеиновой кислоты. Инокулянт также может быть

комбинирован с подходящими дополнительными факторами, например, в форме адъювантов или изготовлен с подходящими носителями.

[000237] В настоящей заявке термин «плазмида», применительно к грузу, относится к любой молекуле внехромосомной ДНК, отличной от хромосомной ДНК и способной к автономной репликации. Предпочтительно термин относится к любой такой молекуле, известной квалифицированному специалисту в данной области техники. Более предпочтительно термин относится к молекуле ДНК, которая способна к автономной репликации в эукариотических клетках и которая кодирует полипептид, представляющий интерес, например, терапевтический белок или иммунологически активный белок, или диагностически детектируемый белок, например, биолюминесцентные белки, такие как GFP или сходный флуоресцентный белок, например, упомянутый в настоящей заявке.

[000238] В настоящей заявке термин «многокомпонентная система» может относиться к любой системе или набору компонентов, который содержит более одного компонента. Такие 2, 3, 4, 5 или более компонентов могут представлять собой разные типы грузов, такие как разные белки, разные нуклеиновые кислоты и т. д., или смеси таких разных типов грузов, например, белок и нуклеиновую кислоту и т. д. Согласно другим особенно предпочтительным вариантам реализации система содержит компоненты, которые, как правило, функционируют вместе или требуются для функционирования определенного способа или для достижения определенной цели. Примерами таких компонентов являются компоненты, необходимые для редактирования генома, включая специфические белки, такие как нуклеазы, элементы РНК, вставки ДНК или другие типы нуклеиновых кислот. Такие подходы к редактированию генома, например, могут представлять собой систему CRISPR/Cas, систему на основе TALEN, систему на основе нуклеазы с «цинковым пальцем» (ZFN), систему на основе мегануклеазы, систему на основе рекомбиназы Cre или FLP и сайтов lox r FRT. Многокомпонентная система может быть обеспечена, например, в виде уже экспрессированных или готовых к применению компонентов. В качестве альтернативы система может быть обеспечена в форме закодированных компонентов, например, обеспеченных на плазмиде или транскрипте, для экспрессии которых необходим клеточный аппарат, и, таким образом, обеспечивающих элементы, необходимые для ее функционирования. Согласно настоящему изобретению конкретно предусмотрено применение системы на основе DRACO, т. е. системы, основанной на активируемых двухцепочечной РНК олигомеризаторах каспазы. Особенно предпочтительным является применение системы CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы с одинаковыми интервалами)/Cas. CRISPR/Cas можно применять для снижения экспрессии

конкретных генов (или групп или сходных генов) или для редактирования геномных последовательностей. Как правило, это достигается за счет экспрессии одноцепочечной РНК в дополнение к гену CRISPR или нуклеазе. Эта методика, как правило, основана на экспрессии гена CRISPR, такого как Cas9, или других сходных генов в дополнение к направляющим последовательностям РНК (см., например, Cong et al. 2013, Science, 339, 6121, 819–823). Соответственно, расщепление двойной цепи может быть нацелено на конкретные последовательности с применением экспрессии соответствующих фланкирующих направляющих последовательностей РНК, которые могут быть обеспечены в виде одного компонента многокомпонентной системы, например, вместе с Cas9 или сходной функциональной активностью. В качестве альтернативы систему CRISPR/Cas можно применять для расщепления мРНК, что снижает экспрессию. Согласно предпочтительному варианту реализации направляющие последовательности РНК и экспрессия гена CRISPR (например, Cas9) могут быть включены как часть конструкции для экспрессии. Система CRIPR/Cas может, соответственно, содержать необходимые нуклеиновые кислоты и ферментные компоненты, которые должны быть обеспечены в качестве груза.

[000239] В настоящей заявке термин «система на основе TALEN» относится к применению TALEN, т. е. эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции, которая представляет собой искусственный рестрикционный фермент, полученный путем гибридизации ДНК-связывающего домена TAL-эффектора с доменом расщепления ДНК. TAL-эффекторы представляют собой белки, которые, как правило, секретируются бактериями *Xanthomonas* или родственными видами, или которые происходят из них и были модифицированы. ДНК-связывающий домен TAL-эффектора может содержать высококонсервативную последовательность, например, последовательность из приблизительно 33-34 аминокислот, за исключением 12 и 13 аминокислот, которые сильно переменчивы (пара переменчивых аминокислотных остатков или RVD) и, как правило, демонстрируют сильную корреляцию со специфичным распознаванием нуклеотидов. Домен расщепления ДНК TALEN может происходить из подходящих нуклеаз. Например, домен расщепления ДНК из эндонуклеазы FokI или из вариантов эндонуклеазы FokI можно применять для конструирования гибридных нуклеаз. TALEN предпочтительно могут быть обеспечены как отдельные частицы из-за особенностей домена FokI, который функционирует как димер. TALEN или компоненты TALEN предпочтительно могут быть сконструированы или модифицированы для нацеливания на любую целевую последовательность ДНК. Такое конструирование можно осуществлять в соответствии с подходящими методологиями, например, Zhang et al., Nature Biotechnology,

1–6 (2011) или Reyon et al., *Nature Biotechnology*, 30, 460–465 (2012). Система на основе TALEN, соответственно, может содержать необходимые нуклеиновые кислоты, например, в виде геномных вставок или направляющих последовательностей, а также ферментные компоненты, которые будут обеспечены в качестве груза.

[000240] В настоящей заявке термин «система на основе нуклеазы с цинковым пальцем (ZFN)» относится к системе искусственных рестрикционных ферментов, которые, как правило, получают путем гибридизации ДНК-связывающего домена с цинковым пальцем с доменом расщепления ДНК. Домены с цинковыми пальцами предпочтительно могут быть сконструированы или модифицированы для нацеливания на любую целевую последовательность ДНК. Такие методы конструирования могут быть известны квалифицированному специалисту или могут быть получены из подходящих литературных источников, таких как Baе et al., 2003, *Nat Biotechnol*, 21, 275-80; Wright et al., 2006, *Nature Protocols*, 1, 1637-1652. Как правило, в ZFN в качестве расщепляющего домена можно применять неспецифический расщепляющий домен из рестрикционных эндонуклеаз типа II, например, из FokI. Поскольку этот расщепляющий домен димеризуется для того чтобы расщепить ДНК, для нацеливания на непалиндромные сайты ДНК, как правило, требуется пара ZFN. ZFN, предусмотренные согласно настоящему изобретению, также могут содержать гибрид неспецифического расщепляющего домена с С-концом каждого домена цинкового пальца. Например, чтобы обеспечить димеризацию двух расщепляющих доменов и расщепление ДНК, как правило, требуются два отдельных ZFN для связывания противоположных цепей ДНК с С-концами, расположенными на определенном расстоянии. Следует понимать, что линкерные последовательности между доменом цинкового пальца и расщепляющим доменом могут требовать, чтобы 5'-конец каждого сайта связывания был отделен приблизительно 5-7 п.н. Согласно настоящему изобретению предусмотрена любая подходящая форма или вариант ZNF, например, классические гибриды FokI или оптимизированный вариант FokI, а также ферменты с модифицированными контактными поверхностями димеризации, улучшенной связывающей функциональной активностью или варианты, которые способны обеспечить гетеродимерные частицы. Система на основе нуклеазы с цинковым пальцем (ZFN), соответственно, может содержать необходимые нуклеиновые кислоты, например, в виде геномных вставок или направляющих последовательностей, а также ферментные компоненты, которые будут обеспечены в качестве груза.

[000241] В настоящей заявке термин «система на основе мегануклеазы» относится к системе, в которой применяются эндодезоксирибонуклеазы, которые, как правило, имеют сайт распознавания в виде двухцепочечных последовательностей ДНК, состоящих из

приблизительно 12-40 нуклеотидов. Мегануклеазы, как правило, функционируют как молекулярные ножницы для ДНК, которые обеспечивают возможность удаления или модификации последовательностей специфичным для последовательности образом. Примеры подходящих мегануклеаз включают эндонуклеазы интронов и эндонуклеазы интеина. Последовательность распознавания мегануклеазы может быть модифицирована с помощью генетического или белкового конструирования для нацеливания на любую целевую последовательность ДНК. Чтобы обеспечить специфичность в отношении последовательности, специфичность существующих мегануклеаз может быть модифицирована путем введения изменения в аминокислотную последовательность с последующим отбором функциональных белков. В качестве альтернативы белковые домены из разных ферментов могут быть гибридизованы с нуклеазами, что приводит к получению химерных мегануклеаз. Такие химерные мегануклеазы могут иметь, например, новый сайт распознавания, состоящий из полусайта мегануклеазы и полусайта белка. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения можно комбинировать оба подхода, т. е. модификацию связывающей последовательности мегануклеазы и гибридизацию с белковым доменом из другого фермента. Более подробная информация, в частности, в отношении возможностей конструирования мегануклеаз, может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Gao et al., 2010, *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 61, 176–87. Система на основе мегануклеазы может содержать, соответственно, необходимые нуклеиновые кислоты, например, в виде геномных вставок или направляющих последовательностей, и ферментные компоненты, которые будут обеспечены в качестве груза.

[000242] В настоящей заявке термин «система Cre-lox» относится к комбинации рекомбиназы Cre и ее соответствующих сайтов распознавания (сайтов lox). В качестве альтернативы система может состоять из рекомбиназы FLP и ее соответствующих сайтов распознавания (сайтов FRT). Делеция последовательностей между повторами может быть достигнута путем обеспечения сайтов распознавания в виде прямых повторов. Аналогичным образом, другой профиль перегруппировки, например, инверсию последовательностей, можно осуществлять, обеспечивая другие ориентации или более двух сайтов распознавания. Более подробная информация может быть получена из Ryder et al., 2004, *Genetics*, 167, 797–813 или Ito et al., 1997, *Development*, 771, 761–771.

[000243] Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения груз может представлять собой фармацевтически или иммунологически активное соединение. В настоящей заявке термин «фармацевтически активное соединение» относится к любому подходящему веществу, лекарственному препарату,

лекарственному средству, клеточному компоненту, ткани или активному фармацевтическому ингредиенту (API), известному квалифицированному специалисту. Эти соединения могут содержать терапевтические белки, определенные выше, радионуклиды, определенные выше, цитотоксические вещества, определенные выше, малые молекулы, определенные выше, пептидные или белковые ингибиторы, определенные выше. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтически активное соединение представляет собой ингибитор клеточной функции. В настоящей заявке термин «ингибитор клеточной функции» относится к любой органической молекуле, пептиду или полипептиду, которые оказывают ингибирующий эффект на физиологические функции, предпочтительно на функцию белка, такую как ферментативные функции. Ингибирование может представлять собой, например, уменьшение активности фермента по сравнению с активностью фермента в отсутствие ингибитора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения термин «ингибировать», таким образом, означает уменьшение активности фермента по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения «ингибировать» означает уменьшение активности фермента на величину от приблизительно 5% до приблизительно 25%, от приблизительно 25% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 75% или от приблизительно 75% до 100%. Также предусмотрено уменьшение активности фермента на величину от приблизительно 95% до 100%, например, уменьшение активности на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Такое уменьшение может быть измерено с применением любого подходящего способа или анализа, известного квалифицированному специалисту, который будет понятен специалисту в данной области техники.

[000244] Примерами таких ингибиторов являются ингибиторы протеаз, например, ритонавир, ингибитор протеазы ВИЧ типранавир или силденафил. Также особенно предпочтительными являются ингибиторы апоптоза. Примеры ингибиторов апоптоза включают белки семейства Bcl-2, такие как Bcl-2, Bcl-XL или Bcl-w. Другие примеры включают cgmA (модификатор ответа цитотоксинов A), который можно применять для ингибирования каспаз 1, 6 и 8. Также предусмотрено применение IAP (ингибиторов

белков апоптоза), включая Cr-IAP, Op-IAP, XIAP, cIAP1, C-IAP2, NAIP, ливин и сурвивин.

[000245] В настоящей заявке термин «иммунологически активное соединение» относится к любому соединению, которое способно вызывать иммунологическую реакцию в организме. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения оно может быть способно к иммуномодуляции в альтернативном варианте. Также предусмотрено, что иммунологически активное соединение представляет собой индуктор иммунологической толерантности.

[000246] В настоящей заявке термин «соединение, способное вызывать иммунологическую реакцию в организме» относится к любому веществу или части вещества, которые распознаются элементами иммунной системы животного, предпочтительно млекопитающего, наиболее предпочтительно человека, и которые приводят к активации врожденной иммунной системы или адаптивной иммунной системы.

[000247] Типичными компонентами врожденной иммунной системы являются система комплемента или природные клетки-киллеры. Система комплемента содержит каскад более чем из 20 белков, которые способны разрушать патогены с помощью антител. Ответ, как правило, активируется путем связывания комплемента с антителами, которые присоединились к патогенам, или путем связывания белков комплемента с углеводами на поверхностях чужеродных элементов, например, бактерий или вирусов. Система комплемента дополнительно содержит протеазы, которые способны разрушать чужеродные элементы, такие как клетки, паразиты или их части (например, яйца), бактерии или вирусы. Другим последствием активации комплемента является выработка сигнальных пептидов, которые привлекают дополнительные иммунные клетки. Природные клетки-киллеры (NK) представляют собой лимфоциты, которые, как правило, разрушают поврежденные клетки хозяина, например, раковые клетки или инфицированные вирусом клетки. Предполагается, что эти клетки не распознаются иммунной системой как собственные и, следовательно, являются мишенью для NK-клеток. Такие клетки, например, клетки, инфицированные вирусами, могут иметь уменьшенное количество ГКГС I на поверхности клетки, что, по-видимому, детектируется NK-клетками. NK-клетки можно обнаружить во всех первичных и вторичных иммунных компартаментах, а также в тканях слизистых оболочек. Они могут дополнительно вырабатывать провоспалительные цитокины, такие как гамма-интерферон. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения NK-клетки могут быть активированы для уничтожения раковых клеток. Их можно предпочтительно

применять для коммуникации с другими иммунными клетками, такими как ДК, НКТ-клетки или Т-клетки, что может привести к адаптивному иммунному ответу при раке. Безотносительно к какой-либо теории, полагают, что НК-клетки и ДК активно взаимодействуют. Опосредуемая ДК активация НК-клеток, как правило, способствует развитию сильного врожденного иммунитета, в то время как активированные НК-клетки, в свою очередь, обеспечивают сигналы для активации и созревания ДК, а также выработки цитокинов, что стимулирует адаптивный иммунитет. Обеспечение экзосом, происходящих из ДК (Dex), или активация ДК может привести, в частности, к активации НК-клеток, что обеспечивает разрушение пораженных клеток, в частности, раковых клеток. Более подробная информация будет известна квалифицированному специалисту или может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Lion et al., 2012, *The Oncologist*, 17, 1256-1270. Как правило, лангерин⁺ клетки подавляют слияние НК-клеток. В соответствии с конкретными вариантами реализации настоящего изобретения активацию лангерин⁺ клеток, например, путем доставки подходящих грузов к указанным клеткам, которые обеспечивают такую активацию, можно применять для активации НК-клеток и/или для внесения вклада в указанную активацию.

[000248] Адаптивная иммунная система, с другой стороны, в первую очередь основана на активности специализированных лейкоцитов, т. е. лимфоцитов, а именно В-клеток и Т-клеток. В-клетки, как правило, участвуют в гуморальных иммунных ответах, в то время как Т-клетки участвуют в опосредуемых клетками иммунных ответах. Как В-клетки, так и Т-клетки содержат молекулы Т-клеточного рецептора (TCR), которые распознают специфические мишени, подвергнутые процессингу и впоследствии презентируемые на молекулах ГКГС, которые могут быть обеспечены или экспрессированы всеми клетками хозяина. Т-клетки могут быть дифференцированы в цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ), также известные как CD8⁺ Т-клетки или киллерные Т-клетки, и хелперные Т-клетки, а также регуляторные Т-клетки. Антигены внутри клетки, как правило, связаны с молекулами ГКГС класса I и переносятся на поверхность клетки молекулой ГКГС класса I, где они могут быть распознаны Т-клеткой. Если TCR специфичен в отношении этого антигена, он связывается с комплексом молекулы ГКГС класса I и антигена, и Т-клетка разрушает презентирующую клетку. Молекулы ГКГС I могут быть обнаружены на поверхности всех ядерных клеток. Молекулы ГКГС класса I, как правило, связывают пептиды, образующиеся в основном в результате разрушения цитозольных белков протеасомой. Комплекс ГКГС I:пептид впоследствии вставляется с помощью эндоплазматического ретикулаума во внешнюю плазматическую мембрану клетки. Эпитопный пептид связан на внеклеточных частях молекулы ГКГС класса I.

Таким образом, функция ГКГС класса I, как полагают, в основном заключается в экспонировании внутриклеточных белков цитотоксическим Т-клеткам (ЦТЛ). Помимо этого ГКГС класса I также могут презентировать пептиды, образующиеся из экзогенных белков, за счет перекрестной презентации, которая представляет собой способность определенных антигенпрезентирующих клеток, например, ДК, поглощать, процессировать и презентировать внеклеточные антигены с молекулами ГКГС класса I цитотоксическим CD8⁺ Т-клеткам. Перекрестный прайминг, который является результатом этого процесса, описывает стимуляцию наивных цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в активированные цитотоксические CD8⁺ Т-клетки. Этот процесс может привести к появлению иммунитета против опухолей и вирусов. Перекрестная презентация также может быть предпочтительной для индукции цитотоксического иммунитета, например, путем вакцинации с применением белковых антигенов, например, вакцинации против опухолей, как описано в настоящей заявке. Молекулы ГКГС I, как правило, связывают пептиды, которые имеют 8-10 аминокислот в длину.

[000249] С другой стороны, хелперные Т-клетки (также известные как CD4⁺ Т-клетки) и регуляторные Т-клетки (также известные как Treg-клетки или супрессорные Т-клетки) распознают антигены, которые связаны с молекулами ГКГС класса II. Молекулы ГКГС II, как правило, обнаруживаются только на антигенпрезентирующих клетках (АПК), таких как дендритные клетки, мононуклеарные фагоциты, эпителиальные клетки тимуса или В-клетки. Загрузка молекул ГКГС класса II, как правило, происходит в лизосомальных компартментах. Например, внеклеточные белки могут подвергаться эндоцитозу и расщепляться в лизосомах, а фрагменты эпитопных пептидов могут быть связаны с молекулами ГКГС II. Как правило, молекулы ГКГС II презентируют антигены длиной приблизительно от 15 до 24 аминокислот.

[000250] В соответствии с настоящим изобретением любой из видов активности, описанных выше, может быть вызван подходящим соединением, например, антигеном или эпитопом. Длина антигена, его присутствие в клеточном компартменте и т. д., может модулировать презентирование на молекулах ГКГС I или ГКГС II и таким образом также может модулировать активацию определенных ветвей иммунной системы. Для противораковой и противовирусной терапии особенно предпочтительно, чтобы было вызвано тесное взаимодействие врожденной и адаптивной иммунных систем, например, за счет активации ДК. Более подробная информация может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Ortner et al., *Oncoimmunology*, 2017, 6, 2, e1260215; Watt et al., 2008, *J Immunol.*, 181, 8, 5323-30 или Walzer et al., 2005, *Blood*, 106, 7, 2252-8.

[000251] В настоящей заявке термин «соединение, способное к иммуномодуляции» относится к любому веществу или части вещества, которые обеспечивают регуляторную корректировку иммунной системы. Соответственно, иммунные ответы могут быть индуцированы, усилены, ослаблены или предотвращены в соответствии с терапевтическими целями. Таким образом, иммуномодуляция может представлять собой, например, активацию (например, в форме активационной иммунотерапии), вызов или усиление иммунного ответа, или она может представлять собой подавление (например, в форме подавляющей иммунотерапии).

[000252] Примеры соединений, способных активировать иммуномодуляцию, включают стимулирующие факторы, такие как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), цитокины, интерлейкины, хемокины, иммуномодулирующие имидные лекарственные средства (IMiD), синтетические олигодезоксинуклеотиды цитозинфосфат-гуанозин (CpG) или глюканы, или крем для усиления иммунитета, такой как имиквимод. Предпочтительными примерами подходящих интерлейкинов являются IL-2, IL-7 и IL-12. Предпочтительными примерами цитокинов являются интерфероны и Г-КСФ. Предпочтительными примерами подходящих хемокинов являются CCL3, CCL26 и CXCL7. Предпочтительными примерами подходящих IMiD являются талидомид и его аналоги, такие как леналидомид, помалидомид и апремиласт.

[000253] Примеры соединений, способных к подавляющей иммуномодуляции, включают иммуноподавляющие лекарственные средства, такие как глюкокортикоиды, цитостатики, антитела, соединения, действующие на иммунофилины. Предпочтительными примерами подходящих глюкокортикоидов являются преднизон, дексаметазон и гидрокортизон. Глюкокортикоиды, как правило, подавляют опосредуемый клетками иммунитет, например, путем ингибирования генов, кодирующих цитокины IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 и TNF-альфа, причем снижение выработки цитокинов приводит к уменьшению пролиферации Т-клеток. Глюкокортикоиды также могут подавлять гуморальный иммунитет, например, вызывая экспрессию меньших количеств рецепторов ИЛ-2 и ИЛ-2 В-клетками, что уменьшает размножение клонов В-клеток и синтез антител. Предпочтительными примерами подходящих цитостатиков являются алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты, например, циклофосфамид, нитрозомочевины, соединения платины. Другие примеры включают антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты, например, метотрексат, аналоги пурина, например, азатриопин или меркаптопурин, аналоги пиримидина, такие как фторурацил. Другая группа подходящих примеров включает цитотоксические антибиотики, такие как дактиномицин, антрациклин, митомицин С, блеомицин или митрамицин.

Предпочтительные примеры подходящих антител включают гетерологичные поликлональные антитела, например, полученные из сыворотки животных, таких как лошади, иммунизированные тимоцитами или лимфоцитами человека. Примеры препаратов поликлональных антител, предусмотренных согласно настоящему изобретению, включают атгам и тимоглобулин. Также предусмотрены моноклональные антитела против CD25 и CD3. Предпочтительными примерами подходящих соединений, действующих на иммунофилины, являются циклоспорин, такролимус, сиролимус и эверолимус. Другие соединения, которые способны к подавляющей иммуномодуляции, представляют собой финголимод, мириоцин, микофенолат, молекулы, связывающие TNF-альфа, такие как проникающие в клетки варианты инфликсимаба, этанерцепта или адалимумаба. Конкретно предусмотренные конкретные примеры включают циклоспорин (который связывается с цитозольным белком циклофилином лимфоцитов и тем самым ингибирует кальциреурин), такролимус (который является внутриклеточным ингибитором кальцинейрина), сиролимус и эверолимус (которые ингибируют выработку IL-2 за счет mTOR путем связывания с цитозольным FK-связывающим белком 12, что блокирует активацию T- и B-клеток), финголимод (который вызывает интернализацию сфингозин-1-фосфатных рецепторов и приводит к изоляции лимфоцитов в лимфатических узлах), мириоцин и микофенолат (который обеспечивает селективное ингибирование инозинмонофосфатдегидрогеназы и приводит к ингибированию биосинтеза гуанозина, что ингибирует пролиферацию B- и T-лимфоцитов).

[000254] В настоящей заявке термин «индуктор иммунологической толерантности» относится к соединению, которое способно индуцировать состояние невосприимчивости иммунной системы к веществам или тканям, которые, как правило, обладают способностью вызывать иммунный ответ в организме. Иммунологическая толерантность может быть центральной или периферической. Центральная толерантность, как правило, индуцируется в тимусе или костном мозге, в то время как периферическая толерантность индуцируется в лимфатических узлах. Применительно к настоящему изобретению индукция центральной толерантности является предпочтительной. Полагают, что периферическая толерантность отвечает за предотвращение гиперреактивности иммунной системы на различные частицы окружающей среды, такие как аллергены или кишечные микробы. Дисфункция системы толерантности, как правило, приводит к аутоиммунным заболеваниям, таким как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, диабет 1 типа, аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа (APS-1), иммунодисрегуляция, полиэндокринопатия или энтеропатия, и предполагается, что она вносит вклад в развитие астмы, аллергии и воспалительного заболевания кишечника. Система толерантности

также имеет решающее значение для трансплантаций и аллотрансплантатов. Кроме того, аллергия и реакции гиперчувствительности, как правило, рассматриваются иммунной системой как ошибочные или чрезмерные реакции, возможно, вследствие нарушенных или недостаточно развитых механизмов периферической толерантности. Как правило, клетки Treg, TR1 и Th3 на поверхностях слизистых оболочек подавляют хелперные CD4 клетки 2 типа, тучные клетки и эозинофилы, которые опосредуют аллергический ответ. Отсутствие Treg-клеток или их локализации в слизистой оболочке может играть роль в аллергических реакциях. Предполагается, что дендритные клетки (ДК) играют важную роль в периферической толерантности. ДК широко присутствуют в периферических нелимфатических тканях, например, в коже, и лимфатических тканях в виде целого ряда подгрупп различных линий дифференцировки и уровней зрелости, в частности, в виде лангерин⁺ клеток. В стационарном состоянии, т. е. в невоспалительном состоянии, большинство дендритных клеток остаются незрелыми, и при слабой антигенной стимуляции и презентации антигена, которые могут обеспечивать костимуляцию, незрелые дендритные клетки, как правило, индуцируют клональное устранение и инактивацию наивных Т-клеток, при этом они приводят к индукции и размножению различных регуляторных Т-клеток, обладающих иммуноподавляющей способностью. Соответственно, предполагается, что незрелые дендритные клетки играют некоторую роль в поддержании иммунологического гомеостаза за счет индукции иммунной толерантности, ассоциированной с регуляторными механизмами, контролирующими функцию Т-клеток. Применение цитокинов, включая по меньшей мере IL-10 и TGF-бета, может привести к появлению толерогенных ДК. Кроме того, инициация поверхностной экспрессии CD80high, CD86high, CD40high и CD83low может применяться для индукции толерантности. Также предусмотрено применение агента, стимулирующего выработку IL-10, такого как дексаметазон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения индукция иммунотолерантности может быть достигнута путем применения 5-аминолевулиновой кислоты (ALA) или ее производных, а также применения цитрата железа (II)-натрия (SFC). Более подробная информация может быть получена из подходящих литературных источников, таких как US 9399029. Особенно предпочтительным является применение соединения, индуцирующего иммунотолерантность, в лангерин⁺ клетках или в отношении них, как описано в настоящей заявке, а также в отношении медицинских состояний, вовлекающих лангерин⁺ клетки.

[000255] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения груз, упомянутый выше, содержит, по существу состоит или состоит из (i)

ракового антигена или эпитопа, или содержит раковый антиген или эпитоп, (ii) антигена или эпитопа аутоиммунного заболевания, или содержит антиген или эпитоп аутоиммунного заболевания, (iii) бактериального антигена или содержит бактериальный антиген или эпитоп, (iv) вирусного антигена или содержит вирусный антиген или эпитоп, (v) паразитарного антигена или содержит паразитарный антиген или эпитоп, или (vi) аллергена или эпитопа аллергена, или содержит аллерген или эпитоп аллергена.

[000256] В настоящей заявке термин «раковый антиген» относится к антигенным веществам, вырабатываемым в опухолевых клетках. Таким образом, термин также обычно может включать клеточные антигены, упомянутые выше. Эти антигенные вещества также могут называться «опухолевыми антигенами» в альтернативном варианте. Эти антигены, как правило, инициируют иммунные ответы у хозяина. Безотносительно к какой-либо теории, в настоящее время полагают, что нормальные белки в организме (т. е. белки, вырабатываемые самим хозяином) не являются антигенными вследствие самотолерантности иммунной системы, это концепция, согласно которой аутореактивные лимфоциты удаляются, прежде чем они превращаются в полностью иммунокомпетентные клетки. Другие белки, которые не подвергаются воздействию иммунной системы, могут инициировать иммунный ответ. Они могут включать белки, которые изолированы от иммунной системы, белки, которые обычно вырабатываются в очень малых количествах (но вырабатываются, например, в гораздо большем количестве в раковых клетках), или белки, которые вырабатываются, как правило, только на определенных стадиях развития клетки/организма, или белки, структура или функция которых изменяется из-за наличия мутации. Соответственно, раковые антигены можно классифицировать на разные группы, например, как продукты мутированных онкогенов и генов-супрессоров опухолей, продукты других мутированных генов, такие как (i) гиперэкспрессированные или аберрантно экспрессированные клеточные белки, (ii) раковые антигены, вырабатываемые онкогенными вирусами, (iii) онкофетальные антигены, (iv) измененные гликолипиды и гликопротеины клеточной поверхности, и (v) дифференцировочные антигены, специфичные для определенного типа клеток. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения антиген может представлять собой опухолеспецифический антиген, который представляет собой антиген, вырабатываемый в результате мутации гена, кодирующего белок, патологическая выработка которого является причиной рака или опухоли. Предусмотренный пример таких опухолеспецифических антигенов представляет собой патологическую форму p53 или ras. В качестве альтернативы, если мутация не связана с развитием опухоли, но приводит к выработке патологического белка, который ассоциирован с раковыми клетками, его

рассматривают как ассоциированный с опухолью антиген (ТАА). Также предусмотрено, что эта группа антигенов является частью груза в соответствии с настоящим изобретением. Группа ТАА, как правило, подразделяется на группу общих ТАА и уникальных ТАА. Среди общих ТАА существуют антигены, которые являются общими для нескольких классов разных видов рака, в то время как уникальные ТАА, как полагают, возникают в результате случайных соматических точечных мутаций, индуцированных канцерогенами, представляя собой, таким образом, неоантигены, уникально экспрессируемые отдельными опухолями. Наличие таких уникальных ТАА можно предпочтительно применять для получения грузов специфичных антигенов, например, в формате вакцины, которые основаны на индивидуальной геномной последовательности, полученной с помощью подходов секвенирования следующего поколения, обеспечивающих информацию о мутаноме пациента и потенциально обеспечивающих информацию об уникальных мутированных пептидах, ассоциированных с раком, которые можно применять для вызова противоопухолевых Т-клеток, если они презентированы в виде антигенов.

[000257] Согласно настоящему изобретению предпочтительно предусмотрено применение одного или более из следующих раковых антигенов: MAGE-A1, NY-ESO-1, SSX-2, Gp-100, мелана-A/Mart-1, тирозиназы, PSA, маммаглобина-A, URLC10, GAA, OFA, циклина B1/WT-1/CEF, VEGFR1, VEGFR2, ТТК, MUC1-KLN, HER2, HPV16 E7, HPV16/18, CEA, KOC1, SL-701, WT1, p53, сурвивина, теломеразы, GSK2302025A, MAGE-3.1, OVA BiP, CO16, DEPDC1, MPHOSPH1, ONT-10, GD2L и GD3L, TF, rsPSMA, MUC-2, PAP; KLN, STF-II, G17DT, ICT-107, LMP2A, NA17-A, NA17.A2, IMA901, hTERT, родственного тирозиназе белка 2 (TRP2), PANVAC, EBNA1/LMP2, TRICOM 5T4, MPHOSPH1 и DEPDC1. Кроме того, настоящее изобретение также относится к любым комбинациям вышеупомянутых антигенов, а также к их производным или модифицированным вариантам или происходящим из них гомологичным белковым/пептидным последовательностям. Также предусмотрено применение дополнительных раковых антигенов, которые могут быть открыты и описаны в будущем. Также предусмотрено применение любого другого подходящего антигена, известного квалифицированному специалисту. Дополнительную информацию можно получить из Tagliamonte et al., 2014, Hum Vaccin Immunother, 10(11), 3332–3346. В настоящей заявке термин «раковый эпитоп» относится к конкретному эпитопу класса ГКГС I или ГКГС II, присутствующему в раковом антигене, например, определенном в настоящей заявке выше. Применение раковых эпитопов можно комбинировать, согласно конкретным

вариантам реализации настоящего изобретения, с дополнительной характеристикой исходного аллеля HLA реципиента.

[000258] Особенно предпочтительным является применение раковых антигенов NY-ESO-1, URLC10, G17DT, MART-1; NA17-A; gp100; hTERT, PAP, MPHOSPH1, DEPDC1, HPV16/18 или STF-II, или эпитопов, присутствующих на этих антигенах.

[000259] В настоящей заявке термин «антиген аутоиммунного заболевания» относится к антигенному веществу, которое приводит к нефизиологическим иммунным ответам, которые атакуют либо собственные ткани, либо безвредные компоненты окружающей среды. Таким образом, аутоиммунное заболевание, как правило, в большинстве случаев представляет собой состояние, возникающее в результате патологических иммунных ответов на нормальную часть тела, при этом могут быть вовлечены почти все части тела. Заболевание включает появление или наличие резервуара самореактивных клеток, которые становятся функциональными в иммунной системе, т. е. в этих случаях не функционируют механизмы, предотвращающие появление самореактивных Т-клеток в результате процесса отрицательного отбора в тимусе, поскольку Т-клетка превращается в зрелую иммунную клетку. Заболевание включает наличие аутоантител, а также аутореактивных лимфоцитов, например, самореактивных Т-клеток. Заболевание может быть ограничено определенными органами или может поражать конкретные ткани в разных местах. Применение антигенов аутоиммунных заболеваний в отношении настоящего изобретения включает индукцию иммунной толерантности против указанных антигенов, например, как описано в настоящей заявке выше. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения для индукции иммунной толерантности можно применять мигрирующие незрелые лангерин⁺ клетки. В частности, презентация, как упомянуто выше, впоследствии может вызвать эффект иммунологической толерантности в отношении указанного антигена, если ДК не активирована. Соответственно, согласно настоящему изобретению предусмотрено, что обработка антигена аутоиммунного заболевания включает цитозольную доставку антигена, приводящую затем к его презентации эффекторным иммунным клеткам, а также явное отсутствие компонента, который может привести к активации ДК, например, активации посредством адьюванта. Безотносительно к какой-либо теории, полагают, что презентация антигенов ДК, например, за счет цитозольной доставки, приведет к презентации указанного антигена на основе ГКГС I. Такая презентация может впоследствии вызывать эффект иммунологической толерантности в отношении указанного антигена, если ДК не активирована. Соответственно, согласно настоящему изобретению предусмотрено, что обработка антигена аутоиммунного заболевания

включает цитозольное обеспечение антигена и явное отсутствие компонента, который может привести к активации ДК, такого как адъювант.

[000260] Аутоиммунные заболевания, для которых антигены могут быть обеспечены в виде грузов, включают, например, антифосфолипидный синдром (синдром aPL), пузырчатку, рассеянный склероз (РС), миастению гравис, болезнь Грейвса, синдром Гудпасчера, микроскопический ангиит, гранулематоз с полиангиитами, системные аутоиммунные ревматические заболевания (SARD), смешанное заболевание соединительной ткани, системную красную волчанку, синдром Шегрена, системный склероз/синдром CREST, полимиозит/дерматомиозит, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, целиакию, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, ANCA-ассоциированные заболевания, антифосфолипидный синдром/тромбоэмболический синдром, анти-GBM заболевание, сахарный диабет, пернициозную анемию или болезнь Крона. Подходящие антигены будут известны квалифицированному специалисту или могут быть получены из литературных источников, таких как Wang et al., *Nucleic Acids Research*, 2017, 45, D1, D769–D776. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предусмотрено применение соответствующих антигенов, таких как beta2-GP1 при синдроме aPL, Dsg3 при пузырчатке, MBP, PLP и/или MOG-1 при рассеянном склерозе, рецептора ACh при миастении гравис, рецептора TSH при болезни Грейвса, коллагена IV типа при синдроме Гудпасчера, p-ANCA при микроскопическом ангиите, c-ANCA при гранулематозе с полиангиитами, DFS70 или происходящего из эпителия хрусталика фактора роста/транскрипционного коактиватора p75 (LEDGF/p75) при системных аутоиммунных ревматических заболеваниях (SARD), U1-snRNP 68/70, U1-snRNP A, U1-snRNP C или U-snRNP B/B' при смешанном заболевании соединительной ткани, Sm, RNP/Sm, SmD, SmD1, SmD2, SmD или рибосомального фосфопротеина P0 при системной красной волчанке, Ro/SS-A или La/SS-B при синдроме Шегрена, центромерного белка B (CENP-B), центромерного белка A (CENP-A), ДНК-топоизомеразы I (Scl-70) при системном склерозе/синдроме CREST, гистидил-тРНК-синтетазы (Jo-1), треонил-тРНК-синтетазы (PL-7), аланил-тРНК-синтетазы (PL-12), глицил-тРНК-синтетазы (EJ) или SRP54 при полимиозите/дерматомиозите, пероксидазы щитовидной железы (TPO; син. MSA), тиреоглобулина при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, тканевой трансглутаминазы (tTG; син. TGase-2) или глиаина при целиакии, цитохрома p450 2D6, формиминотрансферазы-циклодезамидазы (FTCD) при аутоиммунном гепатите, M2, комплекса дегидрогеназы 2-оксокислот с разветвленной цепью (BCOADC), OGDC-E2 или PDC-E2 при первичном билиарном циррозе, миелопероксидазы (MPO) или протеиназы 3

(PR3) при ANCA-ассоциированных заболеваниях, бета2-гликопротеина 1 (бета2-GP1), ранее известного как аполипопротеин Н (Аро Н), при антифосфолипидном синдроме/тромбоэмболическом синдроме, базальной мембраны клубочков (GBM) при анти-GBM заболевании, глутаматдекарбоксилазы (GAD65) при сахарном диабете, внутреннего фактора при пернициозной анемии или гликопротеина 2 (GP2) при болезни Крона. Также предусмотрены эпитопы аутоиммунного заболевания, присутствующие на антигене, предпочтительно том, который определен выше. В настоящей заявке термин «эпитоп аутоиммунного заболевания» относится к специфичному эпитопу ГКГС класса I или ГКГС класса II, присутствующему в антигене аутоиммунного заболевания, определенном в настоящей заявке выше. Применение эпитопов аутоиммунного заболевания, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, можно комбинировать с дополнительной характеристикой исходного аллеля HLA реципиента.

[000261] В настоящей заявке термин «бактериальный антиген» относится к антигенному веществу, вырабатываемому или презентуемому бактерией. Бактериальные антигены могут переноситься, например, белками и полисахаридами или липидами. Они могут включать покрытия, капсулы, клеточные стенки, жгутики, фимбрии или токсины бактерий. Как правило, такие вещества экспонируются на поверхности бактерий. Во многих случаях углеводы в форме капсульных полисахаридов и/или липополисахаридов являются основными компонентами на поверхности бактерий и, соответственно, могут рассматриваться как антигенные структуры. Также предусмотрено, что такие полисахариды и/или липополисахариды имитируются пептидами или белками, которые, соответственно, обеспечивают соответствующий антиген или эпитоп. Согласно настоящему изобретению предусмотрен любой подходящий бактериальный антиген, известный квалифицированному специалисту. Предпочтительно бактериальный антиген или бактериальный эпитоп представляет собой, содержит или происходит из столбнячного токсоида, дифтерийного токсоида, полисахарида *Neisseria meningitidis* или *Bordetella pertussis* в бесклеточной форме. Например, бактериальный антиген или эпитоп представляет собой Т-клеточный эпитоп, происходящий из антигена, присутствующего в CRM, столбнячном токсоеде, дифтерийном токсоеде, комплексе белков внешней мембраны *Neisseria meningitidis* или белке D *Haemophilus influenzae*. Дополнительные примеры и подробная информация могут быть получены из подходящих литературных источников, таких как Detmer and Glenting, 2006, *Microbial Cell Factories*, 5, 23.

[000262] В настоящей заявке термин «вирусный антиген» относится к антигенным веществам, вырабатываемым вирусами. Вирусный антиген, как правило, представляет собой белок или пептидный элемент, который обычно кодируется вирусным геномом. Он

может быть презентирован на поверхности вируса, например, в виде покрытия или оболочки или ее части, или может представлять собой неотъемлемую часть вирусного ядра или других вирусных структур, которые могут быть презентированы, например, клетками после разрушения вируса во внутреннем содержимом клетки. Примеры вирусных антигенов включают вирусные структурные элементы, такие как белок капсида, белок матрикса, белок оболочки и т. д., а также неструктурные белки, такие как холины, обеспечивающие движение белки, белки NS, например, NS2, NSP1 и т. д., или различные виды ферментативной активности, кодируемые вирусами, такие как интеграназа, обратная транскриптаза, нейраминидаза, эстераза и т. д. Предпочтительные антигены происходят из вируса гепатита А (инактивированный температурой цельный вирус), гепатита В и вируса папилломы человека (ВПЧ). Особенно предпочтительным является поверхностный антиген НерВ. Также предусмотрено применение вирусных эпитопов. В настоящей заявке термин «вирусный эпитоп» относится к специфичному эпитопу ГКГС класса I или ГКГС класса II, присутствующему в вирусном антигене, определенном в настоящей заявке выше. Применение вирусных эпитопов, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, можно комбинировать с дополнительной характеристикой исходного аллеля HLA реципиента. Дополнительную информацию можно получить из подходящих интернет-ресурсов, таких как <https://www.who.int/immunization/diseases/en/> (последнее посещение 4 декабря 2018 г.).

[000263] В настоящей заявке термин «паразитарный антиген» относится к антигенным веществам, вырабатываемым паразитами или презентуемым на них. В настоящей заявке термин «паразит» относится к паразитам млекопитающих, предпочтительно паразитам человека. Паразиты, как правило, принадлежат к простейшим или многоклеточным. Основные паразитарные группы представляют собой паразитических простейших и паразитических гельминтов. Простейшие представляют собой одноклеточных эукариотов. Паразитические простейшие, как правило, делятся на четыре группы в зависимости от их средств передвижения и способа размножения: жгутиковых, амёб, споровиков и реснитчатых. В группу жгутиковых входят жгутиковые кишечника и мочеполовой системы, такие как *Giardia* и *Trichomonas*, а также жгутиковые крови и тканей, такие как *Trypanosoma* и *Leishmania*. Примеры амёб включают *Entamoeba*, *Naegleria* и *Acanthamoeba*. Группа споровиков, как правило, проходит сложный жизненный цикл с чередованием половой и бесполой репродуктивных фаз и включает *Cryptosporidium*, *Cyclospora* и *Toxoplasma*, а также малярийных паразитов, т. е. виды *Plasmodium*. Споровики, как правило, являются внутриклеточными паразитами. Реснитчатые представляют собой сложных простейших, несущих реснички. Примером

этой группы является *Balantidium coli*, представитель кишечных реснитчатых человека и свиней. Паразитические гельминты обычно относятся к группам нематод и плоских червей. Примеры плоских червей включают трематод, таких как *Fasciola hepatica*, или цестоду, такую как *Taenia*. Также предусмотрены шистосомные или филяриальные паразиты, такие как *Wuchereria bancrofti* или *Onchocerca volvulus*. Согласно настоящему изобретению предусмотрены антигены любого из вышеупомянутых паразитов или любого другого подходящего паразита, известного квалифицированному специалисту. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения антиген может присутствовать в определенных формах жизненного цикла, например, на яйцах. Особенно предпочтительным является применение малярийных антигенов, например, белковых структур, экспонируемых *Plasmodium* в течение одной из форм его жизненного цикла, таких как богатый цистеином защитный антиген (CyRPA), который является важным компонентом тройного комплекса, включающего гомолог белка, связывающего ретикулоциты 5 (RH5), и RH5-взаимодействующий белок (Ripr). В настоящей заявке термин «паразитарный эпитоп» относится к специфичному эпитопу ГКГС класса I или ГКГС класса II, присутствующему в паразитарном антигене, определенном в настоящей заявке выше. Применение паразитарных эпитопов, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, можно комбинировать с дополнительной характеристикой исходного аллеля HLA реципиента. Дополнительную информацию можно получить из подходящих литературных источников, таких как Tarleton, 2005, *Cellular Microbiology*, 7, 10, 1379-1386 или Higashi, 1988, *Ann Rev Public Health*, 9, 483-501.

[000264] В настоящей заявке термин «аллерген» относится к антигенным веществам, способным стимулировать реакцию гиперчувствительности I типа у индивидуумов с атопией посредством ответов иммуноглобулина E (IgE). Соответственно, аллерген представляет собой тип антигена, который вызывает патологически сильный иммунный ответ, при котором иммунная система защищает организм от предполагаемой угрозы, которая в противном случае была бы безвредной для организма. Применительно к настоящему изобретению под аллергеном в основном понимают белок или пептид. Аллергены могут быть обнаружены в целом ряде источников, включая экскременты пылевых клещей, пыльцу или перхоть домашних животных. Они также могут быть обнаружены в продуктах питания, таких как арахис, орехи, морепродукты или моллюски. Перечень аллергенных белков, который включен в настоящую заявку посредством ссылки, можно найти в SDAP (структурная база данных аллергенных белков), которую можно найти по адресу <http://fermi.utmb.edu>. Все аллергены, упомянутые в указанной базе данных, предусмотрены согласно настоящему изобретению. Также предусмотрен любой

другой аллерген, известный квалифицированному специалисту. В настоящей заявке термин «эпитоп аллергена» относится к специфичному эпитопу ГКГС класса I или ГКГС класса II, присутствующему в аллергене, определенном в настоящей заявке выше. Применение эпитопов аллергена, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, можно комбинировать с дополнительной характеристикой исходного аллеля HLA реципиента. Дополнительная информация будет известна квалифицированному специалисту или может быть получена из подходящих литературных источников, таких как «Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes», опубликованном в *The EFSA Journal*, 2004, 32, 1-197.

[000265] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения средство для переноса может иметь средний размер от приблизительно 1 до 2000 нм, предпочтительно от приблизительно 1 до 1000 нм. В настоящей заявке термин «размер средства для переноса» относится либо к комбинации конъюгата, определенного в настоящей заявке, и незагруженного или пустого носителя, определенного в настоящей заявке, либо к комбинации конъюгата, определенного в настоящей заявке, и носителя, содержащего или ассоциированного с грузом, определенным в настоящей заявке. Размер средства для переноса в значительной степени зависит от характера и формы носителя, например, липосомы или наночастицы, или белка и т. д. Соответственно, он может находиться в диапазоне от 1 нм до 100 нм или в диапазоне от приблизительно 100 нм до 250 нм, или в диапазоне от 250 нм до 1000 нм, или в диапазоне от 1000 до 2000 нм. Размер средства для переноса предпочтительно адаптирован к применению, предусмотренному для средства для переноса, и/или к форме и характеру носителя, включенного в средство для переноса. Например, средство для переноса можно применять в наномасштабном диапазоне, что обеспечивает эффективное поглощение различными типами клеток и селективное накопление лекарственного средства в целевых сайтах. Дополнительная информация в этом отношении может быть известна квалифицированному специалисту или может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Desai et al., 1997, *Pharm Res.* 14, 1568–73 или Panyam and Labhasetwar, 2003, *Adv Drug Del Rev.* 55:329–347. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предусмотрено, что размер средства для переноса адаптирован к размеру кровотока. Соответственно, средство для переноса может иметь размер менее 5 мкм, что позволяет избежать образования агрегатов и снизить риск развития эмболии. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения размер средства для переноса может быть предпочтительно измерен в водном растворе.

[000266] Соответственно, средняя длина средства для переноса может быть измерена с помощью динамического рассеяния света (DLS). Методика DLS представляет собой физический способ, используемый для определения профиля распределения по размерам мелких частиц в суспензии или полимеров в растворе. В рамках DLS временные флуктуации обычно анализируют с помощью функции автокорреляции интенсивности или фотонов. При анализе временных зависимостей функция автокорреляции (ACF) обычно снижается, начиная с нулевого времени задержки, а более быстрая динамика из-за более мелких частиц приводит к более быстрой декорреляции кривой интенсивности рассеяния. Было показано, что ACF интенсивности представляет собой преобразование Фурье спектральной плотности по мощности, и поэтому измерения DLS могут быть одинаково хорошо выполнены в спектральной области. Более подробная информация будет известна специалисту или может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Stetefeld et al., 2016, *Biophysical Reviews*, 8, 4, 409–427.

[000267] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно средство для переноса согласно настоящему изобретению для специфического молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, определенное выше, содержащий или ассоциированный с грузом, определенным выше, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетки. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная композиция дополнительно содержит добавку. В настоящей заявке термин «добавка» относится к любому веществу или соединению, которое облегчает (i) взаимодействие между лигандом и клеткой-мишенью, как определено в настоящей заявке, (ii) доставку груза в клетку-мишень или к ней, как определено в настоящей заявке, (iii) стабилизирует средство для переноса во время хранения, складского хранения и/или применения, или (iv) помогает стимулировать последующие этапы, ассоциированные с индукцией разных видов активности в клетке-мишени, например, высвобождение из эндосом или ядерную транслокацию средства для переноса или груза, и более конкретно процессинг и презентацию антигена в лангерин⁺ клетках.

[000268] Примеры подходящих предусмотренных добавок включают двухвалентные ионы. Предпочтительные двухвалентные ионы представляют собой Ca²⁺ или Zn²⁺. Известно, что лангерин представляет собой лектин, зависимый от двухвалентного иона, в частности, Ca²⁺-зависимый лектин, причем присутствие двухвалентного иона влияет на взаимодействие между лигандом и его когнатным рецептором лангерином. Также предполагается, что присутствие хелаторов, таких как ЭДТА или ЭГТА, в дальнейшем приведет к потере функции лангерина, например, как следует из Valladeau, 2000,

Immunity, 12(1), 71-81. Соответственно, согласно настоящему изобретению конкретно предусмотрено, что в композиции согласно настоящему изобретению не присутствует хелатор, такой как ЭДТА. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения концентрация ионов кальция, т. е. Ca^{2+} , может находиться в диапазоне от 4 мкМ до 1 мМ, например, 4-40 мкМ, от 40 до 500 мкМ, от 500 мкМ до 1 мМ или любое значение в пределах упомянутых значений. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения концентрация ионов цинка, т. е. Zn^{2+} , может находиться в диапазоне от 4 мкМ до 1 мМ, например, 4-40 мкМ, от 40 до 500 мкМ, от 500 мкМ до 1 мМ или любое значение в пределах упомянутых значений. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения применение добавок можно корректировать в зависимости от места применения композиции согласно настоящему изобретению. Соответственно, применение ионов Ca^{2+} может быть предусмотрено только в тех случаях, когда не предусмотрено природное обеспечение Ca^{2+} . Безотносительно к какой-либо теории, полагают, что концентрация Ca^{2+} в эпидермисе человека составляет приблизительно 1-2 мМ, что, как предполагается, насыщает все лангерины и делает их функциональными. Особенно предпочтительным является применение добавки, описанной выше, для пациентов или ситуаций, в которых концентрация Ca^{2+} отклоняется от описанного выше типичного статуса.

[000269] Другим примером подходящей добавки является адьювант. В настоящей заявке термин «адьювант», применительно к композиции, определенной выше, в целом относится к иммунологическому агенту, который модифицирует эффект других агентов, в частности, эффект средства для переноса, содержащего груз или ассоциированного с грузом, упомянутым выше, более конкретно частиц груза, упомянутых выше. Адьювант может иметь, например, стимулирующий эффект в отношении грузов, вызывающих иммунологические реакции. Адьюванты также могут обладать селективными эффектами, специально разработанными для ДК или лангерин⁺ клеток. Особенно предпочтительным является применение адьюванта, который индуцирует созревание ДК и/или эмиграцию ДК из кожи в лимфатические узлы, что, как правило, приводит к активации Т-клеток. Примеры предпочтительных адьювантов включают иммунологически активные соединения, такие как гидроксид алюминия, парафиновое масло, MF59, AS03, MPL, QS21, AS04, AS01, AS02, IC31, CpG-олигонуклеотиды, ISCOMATRIX или виросомы, неполные адьюванты Фрейнда, KLH или BCG.

[000270] Другим примером подходящей добавки является фактор, который стимулирует связывание лиганда на средстве для переноса с лангерином. Такой стимулирующий фактор может представлять собой, например, аллостерический активатор

функции белка, например, малую молекулу, такую как молекулы, описанные в Aretz et al., 2018, Am. Chem. Soc., 140, 44, 14915–14925, или антитело или аптамер. Стимулирующий фактор также может представлять собой металл, обеспечивающий более прочное связывание углеводов.

[000271] Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения композиция в соответствии с настоящим изобретением обеспечена в форме жидкости. Это может включать, например, жидкий раствор, эмульсию или суспензию. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения композиция может содержать растворитель, такой как H₂O, водный раствор сахарозы, буфер, например, фосфатно-солевой буфер, трициновый буфер или буфер HEPES. Также предусмотрена комбинация вышеупомянутых водных систем и добавок, например, любой из упомянутых выше и диметилсульфоксида (ДМСО). ДМСО можно применять в любом подходящем количестве или концентрации до приблизительно 15% (об./об.), например, в концентрации приблизительно 5% (об./об.), 7% (об./об.), 8% (об./об.), 9% (об./об.), 10% (об./об.), 12% (об./об.) или 15% (об./об.). Поверхностно-активные вещества, такие как твин или тритон-X, также могут действовать как добавки и могут быть применены в отношении настоящего изобретения.

[000272] Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит средство для переноса, определенное выше, т. е. включая груз, в любом подходящем количестве. Количество может быть скорректировано в соответствии с формой или типом носителя, например, липосомы, наночастицы, белка и т. д. Кроме того, количество средства для переноса может быть скорректировано в соответствии с количеством рецепторов, которые должны быть связаны, а также положением клетки-мишени; например, для кожи или других тканей могут потребоваться разные количества средства для переноса. Предпочтительно средство для переноса обеспечено в количестве от приблизительно 0,5 до 30 мол.%, более предпочтительно в количестве от приблизительно 1 до 10 мол.%, еще более предпочтительно в количестве от приблизительно 4 до 6 мол.%, наиболее предпочтительно в количестве от приблизительно 4,75 до 5 мол.%. В типичном варианте реализации указанные выше значения относятся к липосомам, например, определенным в настоящей заявке выше. Для других альтернативных носителей количество может варьировать и может быть скорректировано в соответствии с подходящими расчетами, известными квалифицированным специалистам.

[000273] Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит средство

для переноса определенное выше, т.е. включая груз, в любой подходящей плотности. Плотность может быть скорректирована в соответствии с формой или типом носителя, например, липосомы, наночастицы, белка и т. д. Кроме того, плотность средства для переноса можно корректировать в соответствии с количеством рецепторов, которые должны быть связаны, а также положением клетки-мишени; например, для кожи или других тканей может потребоваться разная плотность средства для переноса. Предпочтительно средство для переноса обеспечивают в плотности от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,08 средств для переноса на nm^2 , более предпочтительно в плотности приблизительно 0,065 средств для переноса на nm^2 , например, приблизительно 0,067 средств для переноса на nm^2 для носителя диаметром приблизительно 160 нм. Также предусмотрены дополнительные подходящие значения плотности, которые могут быть определены с учетом размера или диаметра носителя, например, липосомы. Также предусмотрена корректировка плотности таким образом, чтобы расстояние между двумя средствами для переноса составляло приблизительно 4,4 нм. В соответствии с конкретным вариантом реализации настоящего изобретения расчет подходящих значений плотности средства для переноса может быть основан на значении концентрации липидов приблизительно 26 мкМ и средней концентрации липосом приблизительно 75 мкМ. Эти значения могут варьировать и/или могут быть адаптированы в зависимости от типа липосом, размера, диаметра или типа носителя, формы и размера средства для переноса и т. д. Более подробная информация, касающаяся расчета и адаптации плотности средств для переноса в носителе в соответствии с настоящим изобретением, может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Güven et al., 2009, *Journal of Liposome Research*, 19, 2, 148-154 или *Methods of Enzymology*, Vol. 391, 2005, *Liposomes, Part E, Chapter 13, Use of Liposomes to deliver Bactericides to bacterial biofilms*, p. 21.

[000274] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку, включающему приведение средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, определенного выше, или композиции, упомянутой выше, в контакт с дендритной клеткой. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения носитель обеспечен в незагруженном или пустом состоянии, или носитель содержит или ассоциирован с грузом, определенным в настоящей заявке выше. Способ может включать, например, этапы обеспечения средства для переноса в подходящей форме или подходящего строения, размещения средства для переноса вблизи клетки-мишени или облегчения проникновения средства для переноса в клетку-мишень и обеспечения контакта лиганда с когнатным рецептором (лангерином) в клетке-мишени. Факторы,

которые можно применять подходящим образом для улучшения или облегчения нацеленной доставки груза, представляют собой концентрацию и присутствие Ca^{2+} , как описано в настоящей заявке. Кроме того, температура может быть установлена в подходящем диапазоне, например, любая температура или диапазон температур, который обеспечивает эндоцитоз груза, такой как от 4°C до 37°C . Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения способ можно выполнять в соответствии с этапами, упомянутыми в Примере 7.

[000275] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для переноса, определенное выше, или композиции, определенной выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом, например, определенным выше. Особенно предпочтительно указанная фармацевтическая композиция содержит средство для переноса, определенное выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с грузом, выбранным из любого из следующего: малой молекулы, пептида, белка, цитотоксического вещества, нуклеиновой кислоты, металла, радионуклида, вируса, модифицированного вируса, вирусного вектора, инокулянта, плазмиды, многокомпонентной системы, фармацевтически активного соединения, такого как ингибитор клеточной функции, например, ингибитор апоптоза, иммунологически активного соединения, включая соединение, способное вызывать иммунологическую реакцию в организме, иммуномодулятора и индуктора иммунологической толерантности, или ракового антигена или эпитопа, или соединения, содержащего раковый антиген или эпитоп, антигена или эпитопа аутоиммунного заболевания, или соединения, содержащего антиген или эпитоп аутоиммунного заболевания, бактериального антигена или соединения, содержащего бактериальный антиген или эпитоп, вирусного антигена или соединения, содержащего вирусный антиген или эпитоп, паразитарного антигена или соединения, содержащего паразитарный антиген или эпитоп, или аллергена или эпитопа аллергена, или соединения, содержащего аллерген или эпитоп аллергена. Также предусмотрены один или более ингредиентов или компонентов, необходимых для подходов генной терапии или молекулярного редактирования, таких как, например, компоненты CRISPR/Cas или TALEN, описанные в настоящей заявке. Также предпочтительно все упомянутые элементы соответствуют тем, которые определены в настоящей заявке выше применительно к грузу, включая дополнительные примеры упомянутых элементов. Также предусмотрены комбинации упомянутых выше грузов, например, белка и нуклеиновой кислоты, или вируса или вирусного вектора и белка, или малой молекулы и нуклеиновой кислоты или белка и т. д. Особенно предпочтительными

являются комбинации адъювантов и антигенов, например, определенных в настоящей заявке выше, или комплексы РНК-белок и т. д., например, для подходов генной терапии или молекулярного редактирования, определенных в настоящей заявке.

[000276] Необязательно, т. е. в определенных вариантах реализации, фармацевтическая композиция, определенная выше, содержит фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтический адъювант. В настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом или другой общепризнанной фармакопеей для применения у животных, и более конкретно у человека. В настоящей заявке термин «носитель» относится к разбавителю, вспомогательному веществу или фармацевтической основе, с которыми вводят груз или терапевтическое средство. Такой носитель является фармацевтически приемлемым, т. е. нетоксичным для реципиента в применяемой дозировке и концентрации. Он предпочтительно является изотоническим, гипотоническим или слабо гипертоническим и имеет относительно низкую ионную силу, такую как та, которая обеспечивается раствором сахарозы. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно применять в качестве жидких носителей. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, ион натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция, при необходимости, также может содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих агентов или агентов, корректирующих рН. Эти композиции могут принимать форму, например, растворов, суспензий, эмульсий, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны, например, в «Remington's Pharmaceutical Sciences» под ред. E.W. Martin. Некоторые другие примеры веществ, которые можно применять в качестве фармацевтических носителей, включают сахара, такие как глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетаты целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; стеариновые кислоты; стеарат магния; сульфат кальция; карбонат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, масло семян хлопка, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло теобромы; полиолы, такие как пропиленгликоль,

глицерин, сорбит, манит и полиэтиленгликоль; агар; альгиновые кислоты; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; экстракты клюквы и фосфатный буферный раствор; обезжиренное сухое молоко; а также другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах, такие как, например, витамин С, эстроген и эхинацея. Также могут присутствовать смачивающие агенты и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия, а также окрашивающие агенты, ароматизирующие агенты, смазывающие вещества, вспомогательные вещества, таблетующие агенты, стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения ингредиенты фармацевтической композиции можно вводить в инкапсулированной форме, например, в виде инкапсуляции в целлюлозу, в желатине, инкапсулированными с полиамидами, восковыми матриксами или с циклодекстринами.

[000277] Обычно ингредиенты могут поставляться либо по отдельности, либо смешанными в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента.

[000278] Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция изготовлена в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может включать солибилизирующий агент и локальный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Если композиция должна быть введена путем инфузии, она может быть распределена с бутылкой для инфузии, содержащей стерильную воду или физиологический солевой раствор фармацевтического качества. Если композицию вводят путем инъекции, может быть обеспечена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического солевого раствора, чтобы ингредиенты могли быть смешаны перед введением.

[000279] В настоящей заявке термин «фармацевтический адъювант» относится к дополнительным ингредиентам, таким как хлорохин, протонные полярные соединения, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, EtOH, 1-метил-L-2-пирролидон или их производные, или апротонные полярные соединения, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), диэтилсульфоксид, ди-н-пропилсульфоксид, диметилсульфон, сульфолан, диметилформамид, диметилацетамид, тетраметилмочевина, ацетонитрил или их производные. Фармацевтический адъювант также может

представлять собой один или более из поверхностно-активного вещества, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора или изотонического агента. Кроме того, адъювант может стимулировать связывание средства для переноса/лиганда с лангерином. Согласно настоящему изобретению также предусмотрен любой подходящий фармацевтический адъювант, известный квалифицированному специалисту. Упомянутые выше соединения добавляют в условиях, в которых учитываются ограничения по рН.

[000280] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению также может содержать консервант. Консерванты в соответствии с определенными композициями согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими: бутилпарабен; этилпарабен; имидазолидинилмочевину; метилпарабен; О-фенилфенол; пропилпарабен; кватерниум-14; кватерниум-15; дегидроацетат натрия; пиритион цинка; и тому подобное. Консерванты применяют в количествах, эффективных для предотвращения или замедления размножения микробов. Обычно консерванты применяют в количествах от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% по массе от всей композиции, предпочтительно от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,8% и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,5%.

[000281] Композиция согласно настоящему изобретению может быть введена субъекту или пациенту. В настоящей заявке термин «субъект» или «пациент» относится к млекопитающему. Подразумевается, что в настоящей заявке «млекопитающее» имеет то же значение, которое соответствует обычному пониманию специалиста в данной области техники. Предпочтительными млекопитающими являются приматы, коровы, овцы, козы, лошади, собаки, кошки, кролики, крысы, мыши и т. п. Согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой человека.

[000282] В настоящей заявке термин «вводимый» означает введение терапевтически эффективной дозы упомянутой выше фармацевтической композиции любым подходящим путем. Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевается доза, которая вызывает эффекты, для получения которых ее вводят пациенту. Точная доза будет зависеть от цели лечения и может быть установлена специалистом в данной области техники с применением известных методик. Как известно в данной области техники и описано в настоящей заявке, могут потребоваться корректировки системной доставки в противопоставлении с локальной, с учетом возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола, рациона, времени введения, взаимодействия лекарственных средств и тяжести состояния, которые могут быть установлены специалистами в данной области

техники с помощью обычных экспериментов. Предпочтительно введение является локальным, более предпочтительно введение является местным, в частности, на кожу или через кожу.

[000283] Фармацевтическую композицию можно применять как в терапии человека, так и в ветеринарной терапии, предпочтительно в терапии человека. Средства для переноса, описанные в настоящей заявке, ассоциированные с грузами, имеющими целевую терапевтическую активность, могут быть введены пациенту в физиологически приемлемом носителе, описанном в настоящей заявке. В зависимости от способа введения эти элементы могут быть изготовлены с помощью различных способов, обсуждаемых ниже. Концентрация средств для переноса, описанных в настоящей заявке, ассоциированных с грузами, имеющими целевую терапевтическую активность, в составе может варьировать от приблизительно 0,00001 до 100% (масс./масс.). Например, состав может обеспечивать средство для переноса в количестве от приблизительно 0,5 до 30 мол.%, более предпочтительно в количестве от приблизительно 1 до 10 мол.%, даже более предпочтительно в количестве от приблизительно 4 до 6 мол.%, наиболее предпочтительно в количестве от приблизительно 4,75 до 5% мол.%. В типичном варианте реализации значения, упомянутые выше, относятся к липосомам, например, определенным в настоящей заявке выше. Количество других альтернативных носителей может варьировать и может быть адаптировано в соответствии с подходящими расчетами, известным квалифицированному специалисту.

[000284] Также предусмотрены составы, которые содержат средство для переноса в подходящей плотности. Соответственно, в дополнительных конкретных вариантах реализации, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать средство для переноса, определенное выше, т.е. включая груз, в любой подходящей плотности, которую можно корректировать в соответствии с формой или типом носителя, например, липосомы, наночастицы, белка и т. д. Кроме того, плотность средства для переноса можно корректировать в соответствии с количеством рецепторов, которые должны быть связаны, а также положением клетки-мишени; например, для кожи или других тканей может потребоваться разная плотность средства для переноса. Предпочтительно средство для переноса обеспечено в плотности от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,08 средств для переноса на нм^2 , более предпочтительно в плотности от приблизительно 0,065 средств для переноса на нм^2 , например, приблизительно 0,067 средств для переноса на нм^2 для носителя диаметром приблизительно 160 нм. Также предусмотрены дополнительные подходящие значения плотности, которые могут быть определены с учетом размера или диаметра носителя, например, липосомы. Также

предусмотрена корректировка плотности таким образом, чтобы расстояние между двумя средствами для переноса составляло приблизительно 4,4 нм. В соответствии с конкретным вариантом реализации расчет подходящих значений плотности средства для переноса может быть основан на значении концентрации липидов приблизительно 26 мкМ и средней концентрации липосом приблизительно 75 мкМ. Эти значения могут варьировать и/или могут быть адаптированы в зависимости от типа липосомы, размера, диаметра или типа носителя, формы и размера средства для переноса и т. д. Более подробную информацию, касающуюся вычисления и адаптации плотности средств для переноса в носителе в соответствии с настоящим изобретением, можно получить из подходящих литературных источников, таких как *Methods of Enzymology*, Vol. 391, 2005, *Liposomes*, Part E, Chapter 13, *Use of Liposomes to deliver Bactericides to bacterial biofilms*, p. 21.

[000285] Концентрация соединений фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением может быть дополнительно скорректирована в соответствии с предполагаемой схемой дозирования, предполагаемой продолжительностью применения, точным количеством и соотношением всех ингредиентов композиции и другими факторами и параметрами, известными квалифицированному специалисту в данной области техники.

[000286] Средства для переноса, описанные в настоящей заявке, ассоциированные с грузами, имеющими целевую терапевтическую активность в соответствии с настоящим изобретением, могут быть введены по отдельности или в комбинации с другими способами лечения. Для иммунотерапии рака предусмотрены комбинированные способы лечения, например, путем совместного введения ингибиторов контрольной точки, таких как антитела к CTLA-4 и антитела к PD1, для химиотерапии, например, путем совместного введения алкилирующих агентов или ингибиторов ДНК- и РНК-полимеразы, для противовирусной терапии, например, путем совместного введения ингибиторов проникновения, протеазы или ДНК- и РНК-полимеразы и для терапии аутоиммунных заболеваний, например, путем совместного введения глюкокортикоидов или ингибиторов иммунофилинов.

[000287] Введение фармацевтической композиции можно осуществлять различными способами. Введение может представлять собой, например, пероральное, внутривенное, местное, роговичное, назальное, подкожное, внутрикожное или трансдермальное введение. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения введение предназначено для вакцинации или для введения через волосяные фолликулы.

[000288] Кроме того, альтернативные пути введения включают, но не ограничиваются ими, глазное или внутриопухолевое введение или внутривенную инъекцию.

[000289] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения введение можно выполнять с помощью конкретного медицинского устройства, например, иглы, пистолета для вакцинации, пластыря/клея или ингалятора, как будет подробно объяснено ниже.

[000290] Основное внимание в настоящем изобретении уделяется подходам к вакцинации. В настоящей заявке термин «вакцинация» в целом относится к введению антигенного материала (например, в виде вакцины) для стимуляции иммунной системы индивидуума. Соответственно, фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке, может быть введена в виде вакцины. Вакцина может представлять собой (i) инактивированную вакцину, (ii) ослабленную вакцину, (iii) субъединичную вакцину или (iv) ДНК-вакцину. В настоящей заявке термин «инактивированная вакцина» означает вакцину или композицию, содержащую частицы возбудителя инфекции, которые были выращены в культуре и впоследствии уничтожены или разрушены, предпочтительно с применением тепла или формальдегида. Такие частицы возбудителя инфекции, например, вирусы, как правило, не могут реплицироваться, но определенные белки, например, белки капсида, достаточно интактны, чтобы быть распознаны иммунной системой и вызывать ответ. В настоящей заявке термин «ослабленная вакцина» означает вакцину или композицию, содержащую живые частицы возбудителя инфекции с низкой вирулентностью. Как правило, живые ослабленные частицы возбудителя инфекции могут воспроизводиться, но очень медленно. Эти вакцины могут быть получены с помощью любого подходящего способа, известного квалифицированному специалисту, обычно путем выращивания тканевых культур возбудителя инфекции, в которых будет проведен отбор менее вирулентных штаммов, или путем мутагенеза или нацеленных делеций в генах, необходимых для вирулентности. В настоящей заявке термин «субъединичная вакцина» означает вакцину или композицию, содержащую антиген, которая предоставляется иммунной системе без введения частиц возбудителя инфекции, целых или иных форм. Субъединичная вакцина может быть получена с помощью любого подходящего способа, известного квалифицированному специалисту в данной области техники. Как правило, получение может включать выделение специфического белка или части белка или сахарных структур и их введение в виде вакцины или вакцинной композиции. Субъединичная стратегия также может применяться для презентации подходящих раковых антигенов. Термин «ДНК-вакцина» относится к композициям ДНК,

полученным из ДНК инфекционного агента или кодирующим соответствующие структурные компоненты, которые, как правило, вставлены в клетки, например, клетки человека или животных, и экспрессируются в них. Соответственно, ДНК-вакцина может кодировать любой антиген или эпитоп, определенный в настоящей заявке выше.

[000291] Вакцины согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту или индивидууму с помощью любого подходящего способа, предпочтительно путем инъекции с применением либо обычного шприца, либо генного пистолета, либо пистолета для вакцинации, такого как система доставки гена Accell[®]. Доставка ДНК в клетки эпидермиса является особенно предпочтительной, поскольку этот способ введения обеспечивает доступ к ассоциированным с кожей лимфоидным клеткам и обеспечивает кратковременное присутствие ДНК у реципиента. Как нуклеиновые кислоты, так и/или белки/пептиды могут быть инъецированы как подкожно, эпидермально, внутрикожно, внутрь слизистой, например, назально, ректально и вагинально, внутривенно, перорально, так и внутримышечно. Другие способы введения включают пероральное и легочное введение, суппозитории, безыгольную инъекцию, чрескожное и трансдермальное применение. Если в качестве вспомогательных агентов для вакцинного состава применяют твердые вещества, например, вводят адсорбированное вещество или суспендированную смесь ингредиента вакцины со вспомогательным агентом. Согласно особым вариантам реализации настоящего изобретения вакцину вводят в виде раствора или жидкой вакцины, соответственно, в водном растворителе. Предпочтительно введение является эпидермальным, внутрикожным или внутрь слизистой оболочки.

[000292] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения введение осуществляют через волосяные фолликулы. Способ основан на том факте, что пилосебацейный комплекс (состоящий из волосяного фолликула и сальной железы) может участвовать в пассивном переносе лекарственных средств в кожу. Чтобы достичь эпидермиса и выйти из кожи в кровоток, фармацевтическая композиция должна дополнительно проникнуть в слои кератиноцитов, окружающие стержень волоса. При применении таких частиц как наночастицы сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты (PLGA) фармацевтическая композиция может удерживаться в волосяных фолликулах, что обеспечивает перфузию лекарственного средства в коже. Также можно применять эффект депо. Необязательно можно применять адъювант бис-(3',5')-циклический димерный аденозинмонофосфат.

[000293] Также предусмотренные пути введения включают ионофорез, микроиглы, лазеры и струйные инъекторы.

[000294] Микроиглы, как правило, рассматриваются как часть трансдермального пластыря, который помещается на кожу для доставки фармацевтической композиции или ее части к коже и через нее. Микроиглы, как правило, меньше волоса человека, состоят из металлов, Si или биоразлагаемых полимеров. Как правило, микроиглы обеспечены в виде массива. Применение микроигл предпочтительно практически безболезненно. Предпочтительным вариантом подхода с применением микроигл является нанопластырь.

[000295] В настоящей заявке термин «нанопластырь» относится к массиву из тысяч покрытых вакциной микровыступов, которые проникают во внешние слои кожи при нанесении с помощью такого устройства как аппликатор. Кончики микровыступов нанопластыря, как правило, покрыты вакцинным материалом, включая композицию в соответствии с настоящим изобретением, и высвобождают этот материал непосредственно в большое количество иммунных клеток непосредственно под поверхностью кожи. Центральным элементом этой технологии является сам массив нанопластыря, который, как правило, состоит из кремния площадью 1 см^2 с ~ 20000 микровыступов на его поверхности. Массив нанопластыря проникает через защитный внешний слой кожи (роговой слой) и нацеливает иммуноактивирующий материал к богатым иммунными клетками слоям непосредственно под самым внешним слоем кожи, используя микровыступы с оптимизированным расстоянием и длиной.

[000296] Другой предпочтительный путь введения представляет собой местный путь. Местное введение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению можно применять в тех случаях, когда целевое лечение затрагивает области или органы, легко доступные для местного введения. Для местного применения, например, на кожу, мембрану слизистой оболочки, фармацевтическую композицию предпочтительно изготавливают в виде гидрогелевого пластыря, жидкости, крема, мази, пасты, геля, лосьона, ленты, пленки, подъязычной формы, буккальной формы, таблетки, спрея или суппозитория.

[000297] В настоящей заявке термин «гидрогелевый пластырь» относится к пластырям, которые состоят из воздухопроницаемого нетканого полотна, высланного слоем улучшенного адгезионного гидрогеля, который, как правило, защищен прозрачным пленочным покрытием. Гидрогель представляет собой сеть нерастворимых в воде полимерных цепей, иногда встречается в виде коллоидного геля, в котором вода является дисперсионной средой. Гидрогели представляют собой сверхабсорбирующие природные или синтетические полимеры, обладающие степенью гибкости, сходной с таковой для природной ткани, благодаря значительному содержанию в них воды. В соответствии с

определенными вариантами реализации гидропластырь содержит композицию в соответствии с настоящим изобретением в подходящем количестве.

[000298] Подходящая паста содержит средства для переноса, описанные в настоящей заявке, ассоциированные с грузами, имеющими целевую терапевтическую активность в соответствии с настоящим изобретением, суспендированными в носителе. Такие носители включают, но не ограничиваются ими, вазелин, мягкий белый парафин, желтое вазелиновое масло и глицерин.

[000299] Фармацевтическая композиция также может быть изготовлена с подходящей мазью, содержащей активные компоненты, суспендированные или растворенные в носителе. Такие носители включают, но не ограничиваются ими, один или более из глицерина, минерального масла, жидкого масла, жидкого вазелина, белого вазелина, желтого вазелинового масла, пропиленгликоля, спиртов, триглицеридов, сложных эфиров алифатических кислот, таких как сложный цетиловый эфир, соединения полиоксиэтилен-полиоксипропилен, восков, таких как белый воск и желтый пчелиный воск, алифатических спиртов, таких как цетиловый спирт, стеариловый спирт и цетилстеариловый спирт, алифатических кислот, таких как стеариновая кислота, цетилстеарата, ланолина, гидроксида магния, каолина и воды.

[000300] В качестве альтернативы фармацевтическая композиция также может быть изготовлена с подходящим лосьоном или кремом, содержащим активные компоненты, суспендированные или растворенные в носителе. Такие носители включают, но не ограничиваются ими, один или более из минерального масла, такого как парафин, растительных масел, таких как касторовое масло, касторовое масло из семян и гидрогенизированное касторовое масло, моностеарата сорбитана, полисорбата, сложных эфиров алифатических кислот, таких как сложный цетиловый эфир, воска, алифатических спиртов, таких как цетиловый спирт, стеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензилового спирта, спиртов, триглицеридов и воды.

[000301] Фармацевтическая композиция также может быть изготовлена в виде ленты или клея для трансдермального применения. Лента, как правило, приклеивается к коже в виде пластыря и содержит активные компоненты, как правило, в форме с отсроченным высвобождением. Предусмотрено, что клей представляет собой чувствительный к давлению клей, причем в трансдермальный состав могут быть введены усилители проницаемости, а именно поверхностно-активные вещества, алифатические кислоты, терпены и растворители. Чувствительный к давлению клей, как правило, исходно представляет собой высоковязкую и липкую жидкость и остается в этой же форме на всем протяжении срока своего применения. В качестве альтернативы можно применять

чувствительные к давлению клеи на основе каучука, которые содержат либо природный, либо синтетический каучук, в дополнение к маслам, смолам и антиоксидантам, в качестве агента для повышения липкости и стабилизатора. Также предусмотрен чувствительный к давлению клей на акриловой основе, который получают из сложных акрилатных эфиров, метакриловой кислоты, акриламида, метакриламида, N-алкоксиалкила или N-алкилакриламидов без добавления или с добавлением агента для повышения липкости, или чувствительный к давлению клей на основе силикона, который получают в основном из камеди и смолы. Смола является конечным продуктом реакции кремниевого или поликремниевого гидрозоля с триметилхлорсиланом.

[000302] «Подъязычное введение» относится к фармакологическому пути введения, при котором вещества диффундируют в кровь через ткани под языком. При контакте вещества с мембраной слизистой оболочки под языком оно абсорбируется. Поскольку соединительная ткань под эпителием содержит множество капилляров, вещество затем диффундирует в них и попадает в венозное кровообращение. Типичные формы введения для подъязычного введения включают подъязычные таблетки, подъязычные полоски, подъязычные капли, подъязычный спрей, пастилки и т. д.

[000303] Сходно с подъязычным введением буккальное введение относится к местному пути введения, при котором лекарственные средства, удерживаемые или применяемые в буккальной области (за щекой), диффундируют через слизистую оболочку ротовой полости и попадают либо непосредственно в кровоток, либо поглощаются лангерин-положительными антигенпрезентирующими клетками, находящимися в ткани. Полагают, что буккальное введение обеспечивает лучшую биодоступность и более быстрое начало действия по сравнению с пероральным введением, поскольку лекарственное средство не проходит через пищеварительную систему и таким образом избегает метаболизма при первом прохождении. Современные подходы к буккальному введению, предусмотренные согласно настоящему изобретению, включают композитные материалы, такие как мукоадгезивные пленки на основе нановолокон. Эти материалы, как правило, состоят из мукоадгезивного слоя, резервуарного слоя, обеспечивающего контролируемое высвобождение носителя. Предпочтительно материалы содержат наночастицы на основе липидов и защитный поддерживающий слой. Также предусмотренное применение усилителей проницаемости, таких как поверхностно-активные вещества, алифатические кислоты, а также катионные и анионные аминокислоты, может предпочтительно увеличивать буккальную биодоступность. Более подробная информация может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Morales et al., 2017, *Curr Opin Pharmacol*, 36, 22-28.

[000304] В качестве альтернативы фармацевтическая композиция также может быть изготовлена с подходящим гелем, содержащим активные компоненты, суспендированные или растворенные в носителе. Такие носители включают, но не ограничиваются ими, один или более из воды, глицерина, пропиленгликоля, жидкого парафина, полиэтилена, алифатических масел, производных целлюлозы, бентонита и коллоидного диоксида кремния.

[000305] Препараты в соответствии с настоящим изобретением обычно могут содержать дополнительные вспомогательные вещества, такие как те, которые обычно применяют в таких препаратах, например, консерванты, отдушки, пеногасители, красители, пигменты, загустители, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, смягчающие вещества, отделочные агенты, жиры, масла, воски или другие обычные компоненты косметического или дерматологического состава, такие как спирты, полиолы, полимеры, стабилизаторы пены, стимуляторы растворимости, электролиты, органические кислоты, органические растворители или производные силикона.

[000306] Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать смягчающие вещества. Смягчающие вещества можно применять в количествах, которые эффективны для предотвращения или уменьшения сухости. Подходящие смягчающие вещества включают, но не ограничиваются ими: углеводородные масла и воски; силиконовые масла; сложные эфиры триглицеридов; сложные эфиры ацетоглицеридов; этоксилированный глицерид; сложные алкиловые эфиры; сложные алкениловые эфиры; алифатические кислоты; алифатические спирты; простые эфиры алифатических спиртов; простые и сложные эфиры; ланолин и производные; многоатомные спирты (полиолы) и производные простых полиэфиров; сложные эфиры многоатомных спиртов (полиолов); сложные восковые эфиры; производные пчелиного воска; растительные воски; фосфолипиды; стерины; и амиды.

[000307] Таким образом, например, типичные смягчающие вещества включают минеральное масло, в частности, минеральные масла, имеющие вязкость в диапазоне от 50 до 500 универсальных секунд Сейболта, ланолиновое масло, норковое масло, кокосовое масло, масло какао, оливковое масло, миндальное масло, масло ореха макадамии, экстракт алоэ, масло жожоба, сафлоровое масло, кукурузное масло, жидкий ланолин, масло семян хлопка, арахисовое масло, пурцеллиновое масло, пергидросквален (сквален), касторовое масло, полибутен, уайт-спирит без запаха, масло сладкого миндаля, масло авокадо, масло калофиллума, рициновое масло, ацетат витамина Е, оливковое масло, уайт-спирит, цетеариловый спирт (смесь алифатических спиртов, состоящая преимущественно из цетилового и стеарилового спиртов), линоленовый спирт, олеиловый спирт,

октилдодеканол, масло проростков злаков, такое как масло проростков пшеницы, цетеарилоктаноат (сложный эфир цетеарилового спирта и 2-этилгексановой кислоты), цетилпальмитат, диизопропиладипат, изопропилпальмитат, октилпальмитат, изопропилмиристант, бутилмиристант, глицерилстеарат, гексадецилстеарат, изоцетилстеарат, октилстеарат, октилгидроксистеарат, стеарат пропиленгликоля, бутилстеарат, децилолеат, глицерилолеат, ацетилглицериды, октаноаты и бензоаты (C12-C15) спиртов, октаноаты и деканоаты спиртов и многоатомных спиртов, таких как глицоль и глицерин, и ризин-олеаты спиртов и многоатомных спиртов, таких как изопропиладипат, гексиллаурат, октилдодеканоат, диметикон кополиол, диметиконол, ланолин, ланолиновый спирт, ланолиновый воск, гидрогенизированный ланолин, гидроксилированный ланолин, ацетилованный ланолин, петролатум, изопропиланолат, цетилмиристант, глицерилмиристант, миристилмиристант, миристиллактат, цетиловый спирт, изостеариловый спирт, стеариловый спирт и изоцетиланолат и т. п.

[000308] Более того, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением также может содержать эмульгаторы. Эмульгаторы (т. е. эмульгирующие агенты) предпочтительно применяют в количествах, эффективных для обеспечения равномерного смешивания ингредиентов композиции. Подходящие эмульгаторы включают (i) анионные агенты, такие как мыла алифатических кислот, например, стеарат калия, стеарат натрия, стеарат аммония и стеарат триэтаноламина; сложные моноэфиры полиола и алифатической кислоты, содержащие мыла алифатических кислот, например, моностеарат глицерина, содержащий либо калиевую соль, либо натриевую соль; сложные эфиры серной кислоты (соли натрия), например, лаурил-5-сульфат натрия и цетилсульфат натрия; и сложные моноэфиры полиола и алифатической кислоты, содержащие сложные эфиры серной кислоты, например, глицерилмоностеарат, содержащий лаурилсульфат натрия; (ii) катионный хлорид, такой как N-(стеароилколаминоформилметил)пиридий; этосульфат N-сои-N-этилморфолина; хлорид алкилдиметилбензиламмония; хлорид диизобутилфенокситеоксиэтилдиметилбензиламмония; и хлорид цетилпиридия; и (iii) неионогенные агенты, такие как простые эфиры полиоксиэтилена и алифатических спиртов, например, моностеарат; полиоксиэтиленлауриловый спирт; простые эфиры полиоксипропилена и алифатических спиртов, например, пропоксилированный олеиловый спирт; сложные эфиры полиоксиэтилена и алифатических кислот, например, полиоксиэтиленстеарат; сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и алифатических кислот, например, моностеарат полиоксиэтиленсорбитана; сложные эфиры сорбитана и алифатических кислот, например, сорбитан; сложные эфиры полиоксиэтиленгликоля и алифатических кислот, например, моностеарат полиоксиэтиленгликоля; и сложные эфиры

полиолов и алифатических кислот, например, моностеарат глицерина и моностеарат пропиленгликоля; и производные этоксилированного ланолина, например, этоксилированные ланолины, этоксилированные ланолиновые спирты и этоксилированный холестерин.

[000309] Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением также может содержать поверхностно-активное вещество. Подходящие поверхностно-активные вещества могут включать, например, те поверхностно-активные вещества, которые обычно сгруппированы как очищающие агенты, эмульгирующие агенты, усилители пенообразования, гидротропы, солюбилизующие агенты, суспендирующие агенты и вещества, не обладающие поверхностной активностью (облегчают диспергирование твердых веществ в жидкостях).

[000310] Поверхностно-активные вещества обычно классифицируют как амфотерные, анионные, катионные и неионные поверхностно-активные вещества. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают ациламинокислоты и производные, а также N-алкиламинокислоты. Анионные поверхностно-активные вещества включают: ациламинокислоты и соли, такие как ацилглутаматы, ацилпептиды, ацилсаркозинаты и ацилтаураты; карбоновые кислоты и соли, такие как алкановые кислоты, карбоновые кислоты, содержащие сложные эфиры, и карбоновые кислоты, содержащие простые эфиры; сульфоновые кислоты и соли, такие как ацилизетионаты, алкиларилсульфонаты, алкилсульфонаты и сульфосукцинаты; сложные эфиры серной кислоты, такие как сульфаты простых алкиловых эфиров и алкилсульфаты. Катионные поверхностно-активные вещества включают: алкиламины, алкилимидазолины, этоксилированные амины и четвертичные соединения (такие как соли алкилбензилдиметиламмония, алкилбетаины, соли гетероциклического аммония и соли тетраалкиламмония). Неионные поверхностно-активные вещества включают: спирты, такие как первичные спирты, содержащие от 8 до 18 атомов углерода; алканоламиды, такие как амиды, происходящие из алканоламина, и этоксилированные амиды; оксиды аминов; сложные эфиры, такие как этоксилированные карбоновые кислоты, этоксилированные глицериды, сложные эфиры и производные гликоля, моноглицериды, сложные полиглицеридовые эфиры, сложные и простые эфиры многоатомных спиртов, сорбитан/сложные эфиры сорбита и сложные триэфиры фосфорной кислоты; и простые эфиры, такие как этоксилированные спирты, этоксилированный ланолин, этоксилированные полисилоксаны и простые эфиры пропоксилированного полиоксиэтилена.

[000311] В случае обеспечения фармацевтической композиции в виде пленки она может содержать пленкообразователь. Подходящие пленкообразователи, которые

применяют в соответствии с настоящим изобретением, сохраняют композицию гладкой и гомогенной и включают, но не ограничиваются ими: сополимер акриламида/акрилата натрия; сополимер акрилатов аммония; бальзам Перу; целлюлозную камедь; сополимер этилена/малеинового ангидрида; гидроксипропилцеллюлозу; гидроксипропилцеллюлозу; полиакриламид; полиэтилен; поливиниловый спирт; сополимер v_{m}/MA (простой поливинилметилового эфира/малеинового ангидрида); ПВП (поливинилпирролидон); сополимер малеинового ангидрида, такой как PA-18, доступный от Gulf Science and Technology; сополимер ПВП/гексадецен, такой как Ganex V-216, доступный от GAF Corporation; сополимер акриликлакрилата; и тому подобное.

[000312] Обычно пленкообразователи можно применять в количествах от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% по массе от всей композиции, предпочтительно от приблизительно 1% до приблизительно 8% и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,1 DEG/O до приблизительно 5%. Увлажнители также можно применять в эффективных количествах, включая: фруктозу; глюкозу; глутаминовую кислоту; глицерин; мед; мальтит; метилглюцет-10; метилглюцет-20; пропиленгликоль; лактат натрия; сахарозу; и тому подобное.

[000313] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть введена путем ингаляции. Соответственно, фармацевтические препараты могут быть в форме спрея, например, спрея для насоса или аэрозоля. Как правило, аэрозоли в соответствии с настоящим изобретением содержат лекарственное средство или фармацевтическую композицию, один или более хлорфторуглеродных пропеллентов и либо поверхностно-активное вещество, либо растворитель, такой как этанол. Например, можно применять аэрозольные пропелленты, такие как пропеллент 11 и/или пропеллент 114, и/или пропеллент 12. Другие подходящие пропелленты для аэрозолей в соответствии с настоящим изобретением представляют собой пропан, бутан, пентан и другие. Дополнительные пропелленты, которые можно применять и которые, как полагают, обладают минимальным истощающим озон действием по сравнению с обычными хлорфторуглеродами, содержат фторуглероды и водородосодержащие хлорфторуглероды. Дополнительные аэрозоли для лекарственных аэрозольных составов раскрыты, например, в EP 0372777. Как правило, в составы могут быть добавлены один или более адъювантов, таких как спирты, алканы, простой диметиловый эфир, поверхностно-активные вещества (включая фторированные и нефторированные поверхностно-активные вещества, карбоновые кислоты, полиэтоксилаты и т. д.) и обычные хлорфторуглеродные пропелленты в небольших количествах.

[000314] Предпочтительным также является применение 1,1,1,2-тетрафторэтана в комбинации как с соразтворителем, имеющим большую полярность, чем 1,1,1,2-тетрафторэтан (например, спиртом или низшим алканом), так и с поверхностно-активным веществом для получения стабильного состава порошка фармацевтической композиции. Кроме того, поверхностно-активные вещества можно применять в качестве важных компонентов аэрозольных составов, чтобы уменьшить агрегацию фармацевтической композиции и для смазывания, например, клапанов диспергирующего аппарата, при применении в соответствии с другим предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения, что обеспечивает постоянную воспроизводимость срабатывания клапана и точность распределяемой дозы. Как правило, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть предварительно покрыта поверхностно-активным веществом перед диспергированием в 1,1,1,2-тетрафторэтано.

[000315] Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтический аэрозольный состав можно диспергировать с помощью любого подходящего устройства, известного квалифицированному специалисту в данной области техники, предпочтительно с помощью ингалятора с отмеренной дозой (MDI), распылителя, Rotahaler[®] или Autohaler[™].

[000316] Пероральную доставку можно выполнять путем образования комплекса композиции, определенной в настоящей заявке, с носителем, способным противостоять разрушению пищеварительными ферментами в кишечнике животного. Примеры таких носителей включают пластиковые капсулы или таблетки, такие как те, которые известны в данной области техники.

[000317] Подходящий суппозиторий может содержать композицию, определенную в настоящей заявке, вместе с коллоидным диоксидом кремния и масляную основу, которая содержит триглицериды.

[000318] Анализы, например, которые могут быть получены из известных и квалифицированных литературных источников, необязательно можно применять для облегчения идентификации оптимальных соотношений и/или диапазонов дозировок для ингредиентов фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Точная доза и соотношение между ингредиентами фармацевтической композиции, определенной в настоящей заявке выше, которые должны применяться в составе, также будут зависеть от пути введения и точного типа заболевания или нарушения и должны быть определены в соответствии с суждением практикующего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы или соотношения ингредиентов могут быть

экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях (на животных).

[000319] Как правило, лечащий врач и клинические факторы могут определять схему дозирования. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. Типичная доза может быть в диапазоне, например, от 0,001 до 1000 мг; однако также предусмотрены дозы, которые ниже или выше этого примерного диапазона, в частности, с учетом вышеупомянутых факторов.

[000320] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении заболевания или патологического состояния.

[000321] В настоящей заявке термин «заболевание» или «патологическое состояние» означает любое состояние, в отношении которого лечение с применением фармацевтической композиции, определенной выше, может принести пользу, в частности, с применением средства для переноса, в котором носитель содержит или ассоциирован с грузом, предпочтительно с грузом, определенным в настоящей заявке выше.

[000322] В настоящей заявке термины «лечить» или «лечение», если иное не указано в контексте, относятся к терапевтическому лечению и/или профилактическим мерам для предотвращения вспышки или рецидива заболевания или патологического состояния, при этом цель заключается в ингибировании или замедлении (уменьшении) нежелательного физиологического состояния. Для целей настоящего изобретения благоприятные или целевые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение симптомов, уменьшение интенсивности заболевания, стабилизацию (т. е. не ухудшение) состояния заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение патологического состояния и ремиссию (будь то частичную или полную), будь то детектируемую или недетектируемую. «Лечение» также может означать увеличение продолжительности выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние или нарушение, а также тех, кто предрасположен к состоянию или нарушению. Лечение также может включать, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, однократное введение фармацевтической композиции, определенной выше, или многократные введения. Соответствующая схема введения

может быть скорректирована с учетом пола или массы пациента, заболевания, фармацевтической композиции, которая будет применяться, общего состояния здоровья пациента и т. д. Например, схема введения может предусматривать введение каждые 12 ч, 24 ч, 28 ч, 72 ч, 96 ч, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц и т. д. Также предусмотрены паузы или перерывы между фазами введения. Безусловно, эти схемы могут быть скорректированы или изменены практикующим врачом в соответствии с реакцией пациента на лечение и/или течением заболевания или патологического состояния.

[000323] Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении рака. В настоящей заявке термин «рак» относится к патологическому процессу, который приводит к образованию и росту ракового или злокачественного новообразования, т. е. патологической ткани, которая растет в результате клеточной пролиферации, часто быстрее, чем обычно, и продолжает расти после прекращения действия стимулов, которые инициировали новый рост. Злокачественные новообразования, как правило, проявляют частичное или полное отсутствие структурной организации и функциональной координации с нормальной тканью и в большинстве случаев проникают в окружающие ткани, метастазируют в несколько мест, а также, скорее всего, рецидивируют после попытки удаления и вызывают смерть пациента без надлежащего лечения. Таким образом, термин также включает существование и развитие метастазов. В настоящей заявке термин «неоплазия» используется для описания всех раковых патологических состояний и предусматривает или включает патологический процесс, ассоциированный со злокачественными гематогенными, асцитными и солидными опухолями. Типичные виды рака включают, например, рак желудка, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак легких, рак молочной железы, рак шейки матки, рак матки, рак яичников, рак простаты, включая метастатический рак простаты, рак яичек, рак мочевого пузыря, рак почек, рак головного мозга/ЦНС, рак головы и шеи, рак горла, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, лейкоз, меланомный рак кожи, немеланомный рак кожи, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, саркому Юинга, мелкоклеточный рак легких, хориокарциному, рабдомиосаркому, опухоль Вильмса, нейробластому, лейкоз из ворсистых клеток, рак ротовой полости/глотки, рак пищевода, рак гортани, рак почек и лимфому. Также предусмотрены другие формы рака, известные квалифицированному специалисту, или те,

которые могут быть получены из подходящих литературных источников, таких как Pavlopoulou et al., 2015, *Oncol Rep.*, 33, 1, 3–18.

[000324] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения рак может представлять собой рефрактерный рак. Можно предположить, что рак остаточного присутствует, если субъект перенес хирургическое вмешательство в качестве лечения рака. Также предусмотрены метастазирующие формы рака, например, вышеупомянутые формы рака.

[000325] Формы рака, упомянутые выше, предпочтительно можно лечить с применением ассоциированных с опухолью антигенов или раковых антигенов или раковых эпитопов, описанных выше, которые обеспечивают к лангерин⁺ ДК в форме грузов, описанных в настоящей заявке выше. Эти антигены или их эпитопы затем подвергаются процессингу и презентуются лангерин⁺ клетками другим иммунным клеткам и активируют эти иммунные клетки, что приводит к иммунному ответу, например, за счет ЦТЛ или антител против частиц, например, клеток, экспонирующих указанный антиген или эпитоп. Активация этих иммунных клеток, в свою очередь, зависит от созревания и активации лангерин⁺ ДК, что может быть достигнуто путем совместного введения подходящих адъювантов. Неограничивающие примеры таких адъювантов представляют собой агонисты TLR или Rig-I-подобные рецепторы (RLR).

[000326] Также предусмотрено обеспечение разных антигенов и/или разных эпитопов, например, либо происходящих из разных форм рака, либо происходящих из разных белков или гликопротеинов, которые могут присутствовать на одной и той же раковой клетке или в одной и той же опухоли. Эти антигены или эпитопы могут быть обеспечены, например, в полиантигенном гибридном белке или полиэпитопном белке (например, содержащем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более эпитопов), или в виде единичных антигенных/эпитопных звеньев, которые упакованы вместе в целевом грузе. Например, разные антигены могут быть смешаны и впоследствии изготовлены в носителе, например, липосоме, определенной в настоящей заявке. Также предпочтительным является применение различных молекулярных форм опухолевого антигена/эпитопов внутри целевого груза. Например, он может быть обеспечен в виде белка/пептида или в виде нуклеиновой кислоты.

[000327] Согласно другому особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения термин «рак» также относится к гистиоцитозу из клеток Лангерганса (LCH), т. е. злокачественному изменению клеток Лангерганса. Гистиоцитоз из клеток Лангерганса представляет собой редкое заболевание, вовлекающее клональную пролиферацию клеток Лангерганса. Клинически его проявления варьируются от

изолированных поражений костей до полисистемного заболевания. Гистиоцитоз из клеток Лангерганса является частью группы клинических синдромов, называемых гистиоцитозами, которые характеризуются патологической пролиферацией гистиоцитов (т. е. активированных дендритных клеток и макрофагов). Эта форма рака связана с лейкозом и лимфомами. Заболевание, как правило, проявляется в лангерин⁺ клетках, т. е. клетках, экспрессирующих лангерин на поверхности. Безотносительно к какой-либо теории, полагают, что гиперактивная ERK может запускать патогенез LCH. Также полагают, что BRAF-V600E вовлечен в LCH с высоким риском из-за его наличия в гемопоэтических клетках в костном мозге. Это можно объяснить, например, моделью ошибочной дифференцировки миелоидных ДК патогенеза LCH, когда состояние дифференцировки клеток, при котором возникает патологическая активация ERK, определяет клиническую выраженность LCH. Другими факторами, которые могут вносить вклад в аспекты патогенеза, являются воспалительные инфильтраты. Следовательно, предполагается, что LCH представляет собой миелопролиферативное новообразование или воспалительную миелоидную неоплазию. LCH предпочтительно можно лечить путем применения цитотоксических веществ, малых молекул, радионуклидов или белков, например, подходящих антител, таких как антитела против поверхностных маркеров или белков, присутствующих на поверхности клетки, более конкретно антител к лангерину и/или многокомпонентных систем, описанных выше, которые обеспечивают к лангерин⁺ клеткам в виде грузов, описанных в настоящей заявке выше. Подходящие антитела для применения в отношении лечения LCH включают, например, антитела против BRAF V600E, основанные на наблюдении, что BRAF V600E. Также предусмотрены антитела против других мутаций, относящихся к LCH, известных квалифицированному специалисту.

[000328] Согласно другому особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении аутоиммунного заболевания. В настоящей заявке термин «аутоиммунное заболевание» относится к нефизиологическим иммунным ответам, которые атакуют либо собственные ткани, либо безвредные компоненты окружающей среды, определенные в настоящей заявке выше. Примеры аутоиммунных заболеваний, которые предусмотрены согласно настоящему изобретению и которые можно лечить с применением описанной фармацевтической композиции, включают антифосфолипидный синдром (синдром aPL), пузырчатку, рассеянный склероз (РС), миастению гравис, болезнь Грейвса, синдром Гудпасчера, микроскопический ангиит, гранулематоз с полиангиитами, системные аутоиммунные

ревматические заболевания (SARD), смешанное заболевание соединительной ткани, системную красную волчанку, синдром Шегрена, системный склероз/синдром CREST, полимиозит/дерматомиозит, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, целиакию, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, ANCA-ассоциированные заболевания, антифосфолипидный синдром/тромбоэмболический синдром, анти-GBM заболевание, сахарный диабет, пернициозную анемию, витилиго и болезнь Крона. Лечение аутоиммунных заболеваний, описанных выше, основано на применении антигенов аутоиммунных заболеваний или эпитопов аутоиммунных заболеваний, как описано выше, которые обеспечивают к лангерин⁺ ДК в форме грузов, описанных в настоящей заявке выше. В частности, известно, что лангерин⁺ ДК индуцируют размножение регуляторных Т-клеток и антигенспецифичное устранение ЦТЛ, т. е. антигенспецифичную толерантность, в отсутствие костимулирующих сигналов, т. е. без совместной доставки адъювантов. Применительно к этой схеме лечения антигены аутоиммунного заболевания или эпитопы аутоиммунного заболевания, описанные выше, следовательно, предпочтительно обеспечивают без совместной доставки какого-либо адъюванта. Также предпочтительно любой костимулирующий сигнал, который приводит к активации лангерин⁺ ДК, ингибируют любыми подходящими способами, известными квалифицированному специалисту.

[000329] Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении бактериальной инфекции. В настоящей заявке термин «бактериальная инфекция» относится к инфекции пациента, в частности, человека, патогенной бактерией или бактерией, присутствие которой в организме является нежелательным, например, которая является частью бактериального консорциума или биофлоры. Предпочтительные примеры включают внутриклеточные бактериальные инфекции, например, вызываемые бактериями, такими как *Chlamydomphila*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Listeria*, *Francisella*, *Legionella* или *Yersinia*. Дополнительные примеры патогенных бактерий, инфекцию которыми, как предусмотрено, лечат с применением фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают бактерии рода *Bacillus*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Leptospira*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Ureaplasma* и *Vibrio*. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения бактериальная инфекция, которая подлежит лечению, может представлять собой

инфекцию, вызванную одним или более из следующих видов: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia recurrentis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilii*, *Leptospira noguchii*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Особенно предпочтительным является лечение инфекций, вызванных *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* или *Clostridium tetani*.

[000330] Применительно к бактериальной инфекции термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования размножения бактерий, увеличения численности или репликации патогена, который вызывает инфекционное заболевание, и улучшения одного или более симптомов инфекционного заболевания. Инфекции, вызываемые бактериями, упомянутыми выше, предпочтительно можно лечить путем применения бактериальных антигенов или бактериальных эпитопов, описанных в настоящей заявке или тех, которые известны квалифицированному специалисту, например, из подходящего литературного источника, такого как Detmer and Glenting, 2006, *Microbial Cell Factories*, 5, 23, которые обеспечивают к лангерин⁺ ДК в виде грузов, описанных в настоящей заявке выше. Эти антигены или их эпитопы впоследствии подвергаются процессингу и презентуются лангерин⁺ клетками другим иммунным клеткам и активируют эти иммунные клетки, что приводит к иммунному ответу, например, за счет ЦТЛ или антител против частиц, например, бактерий или их частей, экспонирующих указанный антиген или эпитоп. Также предусмотрено обеспечение разных антигенов и/или разных эпитопов, например, либо происходящих из разных бактерий, либо происходящих из разных белков или гликопротеинов, которые могут присутствовать на одной и той же бактерии. Эти антигены или эпитопы могут быть обеспечены, например, в полиантигенном гибридном белке или полиэпитопном белке (например, содержащем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более

эпитопов), или в виде единичных антигенных/эпитопных звеньев, которые упакованы вместе в целевом грузе. Также предпочтительным является применение различных молекулярных форм бактериального антигена/эпитопов внутри целевого груза. Например, он может быть обеспечен в виде белка/пептида, в виде олигосахарида или в виде нуклеиновой кислоты. Также предпочтительно бактериальные антигены/эпитопы, если обеспечено несколько из них, обеспечены в комбинации или в виде смесей антигенов/эпитопов, например, при изготовлении или получении липосомы.

[000331] Согласно другому особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении вирусной инфекции. В настоящей заявке термин «вирусная инфекция» относится к инфекции и/или заболеванию, вызванному патогенным вирусом или инфекционной вирусной частицей (вирионом). Примеры патогенных вирусов или вирионов, инфекцию которыми, как предусмотрено, лечат с применением фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают вирусы из групп: Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papillomaviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения вирусная инфекция, подлежащая лечению, может представлять собой инфекцию, вызванную одним или более из следующих типов вирусов: аденовирусом, вирусом Коксаки, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом гепатита А, вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, вирусом простого герпеса, 1 типа, вирусом простого герпеса, 2 типа, цитомегаловирусом, вирусом герпеса человека, 8 типа, ВИЧ, вирусом гриппа, вирусом кори, вирусом паротита, вирусом папилломы человека, вирусом парагриппа, полиовирусом, вирусом бешенства, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом краснухи, вирусом ветряной оспы. Особенно предпочтительным является лечение инфекций вирусом папилломы человека, вирусом гепатита А и вирусом гепатита В.

[000332] В отношении вирусной инфекции термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования размножения вирусов, увеличения численности или репликации патогена, который вызывает инфекционное заболевание, и улучшения одного или более симптомов инфекционного заболевания. Инфекции, вызываемые вирусами или вирионами, упомянутыми выше, предпочтительно можно лечить с применением вирусных антигенов или вирусных эпитопов, описанных в настоящей заявке или тех, которые известны квалифицированному специалисту, например, из подходящего литературного источника, такого как Ansari et al., 2010, Nucleic Acids Res, 38, D847-D853 или из

интернет-ресурсов, таких как <https://www.who.int/immunization/diseases/en/> (последнее посещение 4 декабря 2018 г.), которые обеспечивают к лангерин⁺ ДК в виде грузов, описанных в настоящей заявке выше. Эти антигены или их эпитопы впоследствии подвергаются процессингу и презентуются лангерин⁺ клетками другим иммунным клеткам и активируют эти иммунные клетки, что приводит к иммунному ответу, например, за счет ЦТЛ или антител против частиц, например, вирусов или их частей, экспонирующих указанный антиген или эпитоп. Также предусмотрено обеспечение разных антигенов и/или разных эпитопов, например, либо происходящих из разных вирусов, либо происходящих из разных белков или гликопротеинов, которые могут присутствовать на одном и том же вирусе или в нем. Эти антигены или эпитопы могут быть обеспечены, например, в полиантигенном гибридном белке или полиэпитопном белке (например, содержащем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более эпитопов), или в виде единичных антигенных/эпитопных звеньев, которые упакованы вместе в целевом грузе. Например, разные антигены могут быть смешаны и впоследствии изготовлены в носителе, например, липосоме, определенной в настоящей заявке. Также предпочтительным является применение различных молекулярных форм вирусного антигена/эпитопов внутри целевого груза. Например, он может быть обеспечен в виде белка/пептида, в виде олигосахарида или в виде нуклеиновой кислоты.

[000333] Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении паразитарной инфекции. В настоящей заявке термин «паразитарная инфекция» относится к инфекции пациента, в частности, человека, паразитом. Такая инфекция может приводить, но не обязательно, к паразитарному заболеванию или паразитозу, т. е. к инфекционному заболеванию, вызванному или передающемуся паразитом. Таким образом, согласно настоящему изобретению предусмотрено не только лечение самих паразитарных заболеваний, но также лечение инфекций, вызываемых паразитами, которые могут не приводить к заболеванию. Такая инфекция может по-прежнему считаться проблематичной для здоровья пациента, например, из-за использования паразитом энергетических или пищевых ресурсов, усталости или психических проблем, например, из-за информации об инфицировании. Также с эпидемиологической точки зрения лечение таких инфекций является предпочтительным, поскольку тем самым можно предотвратить дальнейшее распространение. Паразит, инфекция которым подлежит лечению, представляет собой, как описано выше, паразита млекопитающих, в частности, человека. Паразит, как правило, принадлежит к группе простейших или многоклеточных. Примеры

паразитов, инфекция которыми, как предусмотрено, подлежит лечению с применением фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением, включают жгутиковых, амёб, споровиков и реснитчатых, а также плоских червей. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения паразитарная инфекция, подлежащая лечению, может представлять собой инфекцию, вызванную одним или более из следующих родов или видов: *Giardia*, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Entamoeba*, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Balantidium coli*, *Fasciola hepatica*, *Taenia*, *Schistosoma*, *Wuchereria bancrofti* и *Onchocerca volvulus*. Особенно предпочтительным является лечение инфекций *Plasmodium*.

[000334] Применительно к вирусной инфекции термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования размножения паразитов, увеличения численности или репликации патогена, который вызывает инфекционное заболевание, и улучшения одного или более симптомов паразитарной инфекции. Инфекции, вызванные паразитами, упомянутыми выше, предпочтительно можно лечить путем применения паразитарных антигенов или паразитарных эпитопов, описанных в настоящей заявке или тех, которые известны квалифицированному специалисту, например, из подходящего литературного источника, такого как Ansari et al., 2010, *Nucleic Acids Res*, 38, D847-D853, Tarleton, 2005, *Cellular Microbiology*, 7, 10, 1379-1386 или Higashi, 1988, *Ann Rev Public Health*, 9, 483-501, которые обеспечивают к лангерин⁺ ДК в виде грузов, описанных в настоящей заявке выше. Эти антигены или их эпитопы впоследствии подвергаются процессингу и презентуются лангерин⁺ клетками другим иммунным клеткам и активируют эти иммунные клетки, что приводит к иммунному ответу, например, за счет ЦТЛ или антител против частиц, например, вирусов или их частей, экспонирующих указанный антиген или эпитоп. Также предусмотрено обеспечение разных антигенов и/или разных эпитопов, например, либо происходящих из разных паразитов, либо происходящих из разных белков или гликопротеинов, которые могут присутствовать на одном и том же паразите или в нем. Эти антигены или эпитопы могут быть обеспечены, например, в полиантигенном гибридном белке или полиэпитопном белке (например, содержащем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более эпитопов), или в виде единичных антигенных/эпитопных звеньев, которые упакованы вместе в целевом грузе. Например, разные антигены могут быть смешаны и впоследствии изготовлены в носителе, например, липосоме, определенной в настоящей заявке. Также предпочтительным является применение различных молекулярных форм паразитарного антигена/эпитопов внутри целевого груза. Например, он может быть обеспечен в виде белка/пептида, в виде олигосахарида или в виде нуклеиновой кислоты.

[000335] Согласно еще одному особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении заболевания «трансплантат против хозяина». В настоящей заявке термин «заболевание трансплантат против хозяина» относится к медицинскому осложнению после получения трансплантированной ткани от генетически отличного человека. Заболевание «трансплантат против хозяина», как правило, ассоциировано с трансплантатами стволовых клеток, такими как те, которые появляются с трансплантатами костного мозга. Заболевание «трансплантат против хозяина» также может относиться к другим формам трансплантированных тканей, таким как трансплантаты солидных органов. Безотносительно к какой-либо теории, предполагается, что заболевание вызвано тем фактом, что белые клетки крови иммунной системы донора, которые остаются внутри донорской ткани (трансплантата), распознают реципиента (хозяина) как чужеродного (не своего). Белые клетки крови, присутствующие в трансплантированной ткани, затем, как правило, атакуют клетки организма реципиента, что приводит к заболеванию «трансплантат против хозяина». Заболевание «трансплантат против хозяина» отличается от отторжения трансплантата, которое происходит, когда иммунная система реципиента трансплантата отторгает трансплантированную ткань; с другой стороны, заболевание «трансплантат против хозяина» возникает, когда белые клетки крови иммунной системы донора отвергают реципиента. Заболевание «трансплантат против хозяина» также может возникнуть после переливания крови, если использованные продукты крови не были облучены или обработаны одобренной системой, уменьшающей количество патогенов. Согласно настоящему изобретению предусмотрено обеспечение антигена ГКГС, содержащегося в донорской ткани, например, антигена трансплантата или донора ткани, хозяину донорской ткани (трансплантата). Этот антиген может быть предпочтительно обеспечен к лангерин⁺ ДК в виде груза в подходящем носителе, определенном в настоящей заявке. После этого этапа, как правило, следует размножение и активация ГКГС-специфичных регуляторных Т-клеток, что приводит к антигенспецифичному устранению ЦТЛ, т. е. к антигенспецифичной толерантности в отсутствие костимулирующих сигналов, например, без совместной доставка адьювантов. Применительно к этой схеме лечения антигены или эпитопы аутоиммунных заболеваний, описанные выше, предпочтительно обеспечивают без совместной доставки какого-либо адьюванта. Также предпочтительно любой костимулирующий сигнал, который приводит к активации лангерин⁺ ДК, ингибируют с помощью любых подходящих средств, известных квалифицированному специалисту. Более подробная информация может быть

получена из подходящих литературных источников, таких как Sela et al., 2011, J. Exp. Med., 208, 12, 2489-2496.

[000336] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения также предусмотрено ингибирование иммунологической реакции донора донорской ткани (трансплантата), например, *ex vivo*. Соответственно, настоящее изобретение относится, например, к применению кожных трансплантатов, в которых LC в донорском трансплантате специфически уничтожены *ex vivo*. Более подробная информация может быть получена, например, из Zell et al., 2008, Journal of Investigative Dermatology, 128, 8, 1874, Obhrai et al., 2008, Journal of Investigative Dermatology, 128, 8, 1950-1955; Molinero et al., 2007, American Journal of Transplantation, 8, 1; Adhikary et al., 2018, Transplantation, 102, S235 или Yamano et al., 2011, Blood, 117, 2640-2648.

[000337] Согласно дополнительному особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении локального или системного воспаления. В настоящей заявке термин «воспаление» относится к сложному биологическому ответу тканей организма на повреждающие или вредные стимулы, такие как патогены, поврежденные клетки или раздражители. Воспаление представляет собой защитную реакцию с участием иммунных клеток, кровеносных сосудов и молекулярных медиаторов. Функция воспаления заключается в том, чтобы устранить первоначальную причину повреждения клеток, удалить некротические клетки и ткани, поврежденные в результате первоначального поражения и воспалительного процесса, и инициировать восстановление ткани. Воспаление представляет собой общий ответ и поэтому его считают механизмом врожденного иммунитета. Процесс воспаления инициируется резидентными иммунными клетками, уже присутствующими в пораженной ткани, в частности, резидентными макрофагами, дендритными клетками, гистиоцитами (клетки Лангерганса), клетками Купфера и тучными клетками. Эти клетки обладают поверхностными рецепторами, известными как рецепторы распознавания паттернов (PRR), которые распознают два подкласса молекул: молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMP), и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями (DAMP). PAMP представляют собой соединения, которые ассоциированы с различными патогенами, но которые можно отличить от молекул хозяина. DAMP представляют собой соединения, которые ассоциированы с травмой, относящейся к хозяину, и повреждением клеток. В начале инфекции, ожога или других повреждений эти клетки подвергаются активации (один из PRR распознает PAMP или DAMP) и высвобождают медиаторы воспаления,

ответственные за клинические признаки воспаления. Расширение сосудов и вследствие этого усиление кровотока вызывают покраснение и повышение температуры. Повышенная проницаемость кровеносных сосудов приводит к экссудации белков плазмы и жидкости в ткань, что проявляется в виде отека. Некоторые из высвобождаемых медиаторов, такие как брадикинин, повышают чувствительность к боли. Молекулы медиаторов также изменяют кровеносные сосуды, чтобы обеспечить миграцию лейкоцитов, в основном нейтрофилов и макрофагов, за пределы кровеносных сосудов в ткань. Нейтрофилы мигрируют по хемотаксическому градиенту, созданному локальными клетками, чтобы достичь места повреждения. Потеря функции, вероятно, является результатом неврологического рефлекса в ответ на боль.

[000338] Когда воспаление распространяется у хозяина, т. е. становится «системным воспалением», возникает синдром системной воспалительной реакции. Когда это происходит из-за инфекции, синдром рассматривается как сепсис. Расширение сосудов и нарушение функции органов могут возникать при широко распространенной инфекции, что может привести к септическому шоку и смерти. В отличие от этого «локальное воспаление» ограничивается местом или областью ткани первого вредного стимула, травмы или повреждения. Безотносительно к какой-либо теории, в настоящее время полагают, что клетки Лангерганса модулируют регуляторные Т-клетки, которые, в свою очередь, могут подавлять воспалительные ответы, например, как описано в Sharabi et al., 2018, *Nature Reviews Drug Discovery*, 17, 823–844. Также предполагается тот факт, что клетки Лангерганса могут индуцировать противовоспалительный ответ за счет Treg, информацию можно получить из подходящих литературных источников, таких как Stary et al., 2011, *J Immunol*, 186,1, 103-112. Предусматриваемый подход к лечению включает обеспечение подходящих соединений, таких как глюкокортикостероиды, которые могут содержаться в носителе, определенном в настоящей заявке, к лангерин⁺ клеткам за счет средства для переноса согласно настоящему изобретению. Соответственно, там может быть инициирован противовоспалительный ответ. Дополнительную информацию можно получить из Vartneck et al., 2014, *Nanomedicine*, 10, 6, 1209-20.

[000339] Согласно другому особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения в лечении или предотвращении аллергии. В настоящей заявке термин «аллергия» относится к патологическому состоянию, вызванному гиперчувствительностью иммунной системы к стимулу из окружающей среды, который в обычных условиях, т. е. у здорового субъекта, вызывает незначительные проблемы или не вызывает их. Следовательно, аллергия представляет собой состояние,

при котором у пациента возникает патологически сильный иммунный ответ, при котором иммунная система защищает организм от предполагаемой угрозы, которая в противном случае была бы безвредной для организма. Предполагается, что лежащий в основе механизм вовлекает антитела иммуноглобулины Е (IgE), связывающиеся с аллергеном, например, определенным в настоящей заявке выше, и с рецептором на тучных клетках или базофилах, в которых он инициирует высвобождение воспалительных химических веществ, таких как гистамин.

[000340] Согласно другому особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, определенная в настоящей заявке выше, предназначена для применения при гипосенсибилизации. В настоящей заявке термин «гипосенсибилизация», который также известен как десенсибилизация или гипосенсибилизация, представляет собой иммунотерапию аллергеном в форме медикаментозного лечения некоторых типов аллергий, которое основывается на введении повышающихся доз аллергенов, чтобы запустить иммунные ответы от выработки IgE в сторону индукции ответов регуляторных Т-клеток, что стимулирует аллергенспецифичную толерантность. Настоящее изобретение можно применять для непосредственной индукции ответов регуляторных Т-клеток с более высокой эффективностью за счет селективной доставки аллергенов к лангерин⁺ ДК, в частности, к клеткам Лангерганса, в отсутствие адъювантов.

[000341] Согласно настоящему изобретению также предусмотрено лечение любого другого заболевания или медицинского состояния, которое непосредственно или косвенно связано с клетками, экспрессирующими лангерин на своей поверхности, в частности, ДК. В частности, груз, который может содержаться или может быть ассоциирован с носителем, определенным в настоящей заявке выше, может представлять собой активное фармацевтическое или иммунологическое соединение, способное, например, вызывать иммунологическую реакцию в организме, которое действует как иммуномодулятор, как индуктор иммунологической толерантности или как ингибитор клеточной функции, например, ингибитор апоптоза. Более того, активное фармацевтическое или иммунологическое соединение, которое доставляется в лангерин⁺ клетку, может обеспечивать специфичную активацию или подавление иммунной системы при указанной доставке, предпочтительно за счет типичных для ДК путей. Эту активацию или модуляцию иммунной системы можно применять для лечения или предотвращения заболевания *in vivo*. Соответственно, заболевание, подлежащее лечению, может быть еще не развившимся или уже существует у субъекта, подлежащего лечению.

[000342] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей средство для переноса, определенное выше, или композицию, определенную выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с диагностически подходящим грузом. В настоящей заявке термин «диагностически подходящий груз» относится к частицам груза, выбранным из любого из следующих: малой молекулы, пептида, белка, нуклеиновой кислоты, металла, радионуклида, токсина, красителя и пигмента. Предпочтительно все упомянутые элементы соответствуют тем, которые определены в настоящей заявке выше применительно к грузу, включая дополнительные примеры упомянутых элементов. Особенно предпочтительными являются красители, которые можно применять для нацеливания на лангерин⁺ клетки и их визуализации в различных ситуациях, например, в коже или лимфатической ткани. Также предусмотрены комбинации грузов, упомянутых выше, например, белка и нуклеиновой кислоты, или белка и красителя, или малой молекулы и красителя и т. д. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения упомянутый носитель может содержать или может быть ассоциирован с диагностически подходящим грузом, например, красителем, и в то же время с терапевтически подходящим грузом, например, малой молекулой и т. д., как определено в настоящей заявке. Соответственно, наличие диагностически подходящего груза можно применять для детектирования и/или подсчета доставки терапевтически подходящего груза. Диагностическая композиция также может содержать фармацевтически приемлемый носитель, определенный в настоящей заявке выше в отношении фармацевтических композиций, или фармацевтический адъювант, определенный в настоящей заявке выше в отношении фармацевтических композиций.

[000343] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения диагностическую композицию, определенную в настоящей заявке, можно применять для непосредственной диагностики заболеваний, связанных с клетками Лангерганса, например, гистиоцитоза LC, причем указанная диагностическая композиция может содержать маркер/биомаркер, специфичный для заболевания, или может содержать подходящий компонент, который позволяет детектировать гистиоцитоз LC.

[000344] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения диагностическую композицию, описанную в настоящем документе, можно применять для прогностических и/или предсказательных целей. Например, диагностическую композицию можно применять для оценки изменений уровня активации клеток Лангерганса и/или уровней перекрестной презентации специфичных для заболевания антигенов или аллергенов, например, до, во время или после лечения, предпочтительно

непосредственно после лечения. Такие варианты применения конкретно предусматривают диагностические композиции, содержащие меченые маркеры для сигналов активации, такие как маркеры уровня РНК, пептида или белка. Эти маркеры могут быть доставлены или совместно доставлены с дополнительными компонентами, такими как фармацевтически активные соединения, определенные в настоящей заявке, к клетке-мишени, т. е. лангерин⁺ клетке, за счет средства для переноса и носителя, определенных в настоящей заявке.

[000345] Следовательно, меченый маркер сигналов активации (на уровне РНК, пептида/белка) может быть совместно доставлен с применением системы согласно предпочтительному варианту реализации, диагностическая композиция, определенная выше, предназначена для применения в детектировании или мониторинге подхода к лечению и/или эффективности указанного подхода к лечению, основанного на фармацевтической композиции, определенной в настоящей заявке, против рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления или аллергии.

[000346] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу определения подходящей дозы для нацеленной на дендритные клетки терапии заболевания, включающему: (а) приведение популяции лангерин⁺ клеток в контакт с соединением, которое может быть введено в клетки; (b) определение количества клеток, которые включили указанное соединение; (с) определение подходящей дозы соединения путем сравнения количества клеток со включенным соединением и исходной популяции. В настоящей заявке термин «терапия, нацеленная на дендритные клетки» относится к применению фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке. Предпочтительно термин относится к формам терапии или вариантам применения фармацевтических композиций, которые включают взаимодействие средства для переноса, определенного в настоящей заявке, более предпочтительно содержащего груз, определенный в настоящей заявке, за счет лиганда как части конъюгата, определенного в настоящей заявке, и когнатного рецептора лангерина. Соответственно, заболевание может представлять собой любое заболевание, упомянутое в настоящей заявке выше, например, рак, или бактериальную, вирусную, паразитарную инфекцию, аллергию и т. д. Этап «приведения популяции лангерин⁺ клеток в контакт с соединением» означает, что указанное соединение приводят в контакт с указанной клеткой или доставляют в непосредственной близости от нее, или доставляют к указанной клетке, предпочтительно за счет средства для переноса, определенного выше. Клетки либо происходят из культуры

клеток *in vitro*, либо представляют собой клетки *ex vivo*, полученные из кожи пациента. Особенно предпочтительно количество применяемых клеток определено или известно. Соответственно, эти клетки могут быть обеспечены в замкнутом окружении, например, в реакционной камере и т. д. Соединение представляет собой «соединение, которое поддается введению в клетки» это означает, что соединение может быть интернализовано лангерин⁺ клетками, например, с помощью эндоцитоза. Такой подход может включать, например, этап *in vitro*, на котором окрашивают ЛС или на котором проводят анализ методом проточной цитометрии. Введение соединения предпочтительно можно выполнять за счет эндоцитоза в лангерин⁺ клетках.

[000347] Например, в конкретном варианте реализации подход может быть реализован как подход *in vitro*, в котором лангерин⁺ клетки могут быть помечены с применением композиции в соответствии с настоящим изобретением, например, содержащей краситель. Также предусмотрено применение проточной цитометрии для отделения меченых клеток от немеченых. Также предусмотрена реализация в виде подхода *in vivo* или в виде комбинированного подхода *in vitro/ex vivo*. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения соединение может представлять собой груз, определенный в настоящей заявке выше, предпочтительно краситель или пигмент, более предпочтительно он представляет собой Alexa Fluor 647.

[000348] Этап «определения количества клеток, которые включили указанное соединение», применяемый на этапе b) способа, относится к любому подходящему способу анализа, который позволяет дифференцировать клетки, которые включили (встроили) соединение, от клеток, которые не включили его. Предпочтительно этот способ представляет собой способ детектирования флуоресценции, который позволяет идентифицировать те клетки, которые включили краситель или пигмент, от тех, которые не включили его. Более предпочтительно этот способ основан на применении Alexa Fluor 647. Соответственно, количество клеток, которые включили соединение, по сравнению с клетками, которые не включили указанное соединение, можно определить путем подсчета тех клеток, которые демонстрируют, например, сигнал флуоресценции или окрашивание, и вычитания этого количества из количества первоначально обеспеченных клеток, т. е. общего количества клеток, применяемых в анализе, в результате этого будет получено количество нефлуоресцентных или неокрашенных клеток. Наконец, доза соединения или любого сходного или сопоставимого соединения по аналогии может быть определена путем корреляции количества применяемого соединения с количеством или процентным содержанием клеток со включенными соединениями. Соответственно, процент клеток со включением соединений можно увеличить путем увеличения количества соединения,

доставляемого в клетки. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения также могут быть изменены альтернативные параметры, например, наличие добавок, состав соединения, наличие двухвалентных ионов и т. д. Таким образом, «подходящая доза», в соответствии с определенными вариантами реализации, может представлять собой процентное значение 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более 90% клеток, которые демонстрируют включение соединения, например, о чем свидетельствует флуоресценция в соответствии с этапами, описанными выше. Кроме того, способ можно выполнять, как описано в примерах, например, в примере 10. Дополнительную информацию можно получить из подходящих литературных источников, таких как Boyd and Jackson, 2015, Cell Host & Microbe, 17, 301-307.

[000349] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения сравнение клеток со включенными соединениями с клетками без включенного соединения можно выполнять спустя период в 1-3 дня, например, через 24 ч, 30 ч, 36 ч, 40 ч, 48 ч, 55 ч, 60 ч, 65 ч или 72 ч.

[000350] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения количество клеток со включенным соединением можно сравнить с наблюдаемыми литературными результатами или результатами, полученными из базы данных или интернет-хранилища. Например, процент включения, рассчитанную подходящую дозу и т. д. соединения можно сравнить, например, с данными для других соединений в одном и том же анализе или аналогичном анализе из базы данных. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения база данных может представлять собой базу данных, разработанную с применением информации из различных подходов/различных соединений в соответствии с настоящим изобретением. Также для такой базы данных может применяться информация из других проектов, выходящих за рамки настоящего изобретения.

[000351] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к медицинскому набору, содержащему по меньшей мере один элемент, выбранный из средства для переноса, определенного в настоящей заявке выше, и/или композиции, определенной в настоящей заявке выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом. Набор необязательно может содержать листок-вкладыш с инструкциями. В настоящей заявке термин «медицинский набор» включает любую фармацевтическую композицию, определенную выше, медицинское устройство, терапевтическое средство, упомянутое выше, и т. д. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения медицинский набор также может представлять собой набор для вакцинации, для диагностической,

прогностической или предсказательной цели, содержащий подходящие ингредиенты для выполнения вакцинации, для выполнения диагностики заболевания, ассоциированного с лангерином, например, определенного в настоящей заявке, или прогностического или предсказательного определения состояния здоровья в отношении такого заболевания. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения медицинский набор может содержать любое медицинское устройство в упаковке. В настоящей заявке термин «медицинское устройство» включает шприц, иглу, например, иглу шприца, пистолет для вакцинации, пластырь или ингалятор, предпочтительно те, которые определены в настоящей заявке выше. Средство для переноса согласно настоящему изобретению или его композиция могут быть введены, например, с помощью медицинского устройства. Кроме того, средство для переноса или его композиция могут храниться в медицинском устройстве. В настоящей заявке термин «вкладыш в упаковку» или «листок-вкладыш с инструкциями» используется для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показании (ях), применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов. Листок-вкладыш с инструкциями может представлять собой часть медицинского набора.

[000352] Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей средство для переноса, определенное выше, или композицию, определенную выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с грузом инокулянта, например, определенным в настоящей заявке выше.

[000353] В настоящей заявке термин «вакцина» следует рассматривать как композицию, содержащую, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, средство для переноса или композицию, определенные выше, которая подходит для вакцинации субъекта. Вакцинная композиция была описана в настоящей заявке выше в отношении фармацевтических композиций. Особенно предпочтительно вакцина содержит адъювант, в частности, иммунологический адъювант, описанный выше. Вакцина может содержать, например, терапевтически эффективное количество средства для переноса, содержащего груз, определенный выше. Например, вакцина может содержать, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, белки и/или нуклеиновые кислоты в качестве иммуногенных элементов.

[000354] В настоящей заявке термин «вакцинация» относится к вызову иммунного ответа против опухоли за счет ракового антигена, против бактериальной инфекции за счет бактериального антигена, против вирусной инфекции за счет вирусного антигена, против паразитарной инфекции за счет паразитарного антигена, определенных выше, у субъекта,

включая введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса, содержащего груз, определенный выше. Предпочтительно носитель средства для переноса согласно настоящему изобретению содержит груз, который представляет собой или содержит раковый антиген или эпитоп, определенные выше, бактериальный антиген или эпитоп, определенные выше, вирусный антиген или эпитоп, определенные выше, паразитарный антиген или эпитоп, определенные выше. Также предусмотрена вакцинация с применением частиц, описанных в отношении заболевания «трансплантат против хозяина», определенного выше. Согласно настоящему изобретению, в частности, предусмотрено применение носителей на основе липосомы или наночастицы, определенных в настоящей заявке, для целей вакцинации. Также предпочтительно носитель на основе липосомы или наночастицы содержит пептидный или белковый антиген, описанный в настоящей заявке. Соответственно, пептидный или белковый антиген может содержаться или может быть инкапсулирован в указанном носителе на основе липосомы или наночастицы, описанном в настоящей заявке. Введение указанного носителя предпочтительно представляет собой внутрикожную инъекцию, описанную в настоящей заявке, или чрескожное введение, описанное в настоящей заявке, предпочтительно введение с помощью пластырей с микроиглами.

[000355] Вакцину, в предпочтительных вариантах реализации, можно применять для лечения или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина».

[000356] Иммунизацию можно выполнять в соответствии с любой схемой или графиком, известным квалифицированному специалисту, например, тем, который может быть получен из www.who.int/immunization/documents/en/ (последнее посещение 4 декабря 2018 г.) или аналогичных источников информации. Схема может содержать, например, несколько доз вакцинной композиции, содержащей средство для переноса или композицию, определенные выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекту вводят по меньшей мере 1 дозу вакцинной композиции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вакцинация состоит из 1 дозы вакцинной композиции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъект получает начальную вакцинацию 2 дозами, но не получает дополнительные введения вакцинной композиции или получает дополнительное введение после заранее определенного периода времени, составляющего по меньшей мере 1 месяц или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т. д. лет. Интервал между введением нескольких, например, двух или более, доз вакцины также может варьировать

от 1 недели до приблизительно одного года или более, или от 1 месяца до одного года, или от 1 до 3 месяцев.

[000357] Введение вакцины может быть выполнено в соответствии с любой подходящей схемой введения и любым подходящим путем, например, подкожным, трансдермальным, внутрикожным, внутримышечным, пероральным, через роговицу или назальным путем, внутривенно, местно или через волосяные фолликулы и т. д. Особенно предпочтительным является применение трансдермального, внутрикожного или подкожного путей, например, в виде внутрикожной инъекции. Нанесение предпочтительно выполняют с помощью игл, микроигл, нанопластырей, гидрогелевых пластырей, пистолетов для вакцинации и т. д., как описано выше.

[000358] Аналогичным образом, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против рака, бактериальной инфекции, вирусной инфекции или паразитарной инфекции у субъекта, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса, определенного выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом, определенным выше, или композиции, определенной выше, при этом указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом, определенным выше, или фармацевтической композиции, определенной выше, или вакцины, определенной выше. Способ по существу включает этапы обеспечения иммуноактивного соединения, упомянутого в настоящей заявке, к лангерин⁺ клетке, что побуждает указанную лангерин⁺ клетку включать указанное соединение, подвергать процессингу и экспонировать его или одну или более его частей на своей поверхности, чтобы индуцировать реакцию других иммунных клеток или иммунной системы, или вызвать любым другим подходящим способом иммунный ответ за счет лангерин⁺ клеток. Способ может включать, особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, этапы вакцинации, определенные в настоящей заявке выше. В частности, можно применять схемы и графики вакцинации, упомянутые выше.

[000359] В настоящей заявке термин «эффективное количество» включает количество, эффективное в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения целевого результата. Эффективное количество соединения может варьировать в зависимости от таких факторов как патологическое состояние, возраст и масса субъекта, а также способности соединения вызывать целевой ответ у субъекта. Схемы дозирования могут быть скорректированы, чтобы обеспечить оптимальный терапевтический ответ. Эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором

терапевтически благоприятные эффекты перевешивают любые токсические или вредные эффекты (например, побочные эффекты) ингибирующего соединения.

[000360] В настоящей заявке термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству вводимого соединения, достаточному для предотвращения развития или облегчения до некоторой степени одного или более из симптомов состояния или нарушения, которое лечат.

[000361] Терапевтически эффективное количество соединения (т. е. эффективная дозировка) может быть определено с учетом массы тела пациента и других факторов, известных квалифицированному специалисту. Терапевтически эффективное количество также может быть определено как концентрация, например, в диапазоне пМ или мкМ. Квалифицированный специалист поймет, что определенные факторы могут влиять на дозировку, необходимую для эффективного лечения субъекта, включая, но не ограничиваясь ими, тяжесть заболевания или нарушения, предыдущие способы лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта с применением терапевтически эффективного количества соединения может включать однократную обработку или предпочтительно может включать ряд обработок. В одном примере субъекта лечат с применением соединения один или несколько раз в день в течение приблизительно от 1 до 50 недель или любого другого подходящего периода времени. В другом примере субъекта можно лечить ежедневно в течение двух или более лет в случае хронического состояния или недомогания. Также будет понятно, что эффективная дозировка соединения, применяемого для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в ходе конкретного лечения.

[000362] Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления или аллергии, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса, определенного выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом, композиции, определенной в настоящей заявке выше, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом, фармацевтической композиции, определенной выше, или вакцины, определенной выше. Способ может включать любую подходящую схему введения, описанную в настоящей заявке выше. Соединение, подлежащее применению в способе, представляет собой, в особенно предпочтительном варианте реализации, фармацевтическую композицию,

описанную выше, или вакцину, описанную в настоящей заявке выше. Способ лечения, согласно особенно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, предусматривает введение с помощью перорального, роговичного, назального, внутривенного, местного, подкожного, накожного, внутрикожного, трансдермального пути или вакцинацию, или введение через волосяные фолликулы.

[000363] Введение средства для переноса, композиции, фармацевтической композиции или вакцины можно осуществлять в комбинации с химиотерапевтическим агентом, в частности, в лечении рака. Подходящие примеры включают ингибиторы контрольных точек или CAR T-клетки. Химиотерапевтический агент предпочтительно может представлять собой любое цитотоксическое вещество, упомянутое выше. Лечение химиотерапевтическим агентом предпочтительно выполняют другим путем, чем описанное в настоящей заявке взаимодействие с ДК, т. е. не за счет лангерин⁺ клетки. Например, химиотерапевтический агент можно вводить системным образом или внутривенно и т. д. Соответственно, химиотерапевтический агент может поддерживать подход к вакцинации против рака путем химиотерапевтического уничтожения раковых клеток. Например, подход, основанный на комбинации с химиотерапевтическим агентом, может быть основан на системной химиотерапии, которая способна модулировать иммунные фенотипы остаточных опухолевых клеток, например, после того, как опухолевая масса была оптимально уменьшена хирургическим путем. Другой подход может быть основан на усилении презентации опухолевых антигенов путем активации экспрессии самих опухолевых антигенов или молекул ГКГС класса I, с которыми связываются антигены. Кроме того, химиотерапию можно применять для активации костимулирующих молекул (например, B7-1) или подавления коингибирующих молекул (например, PD-L1/B7-H1 или B7-H4), экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, что приводит к повышению устойчивости активности эффекторных Т-клеток. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения химиотерапию можно применять для повышения чувствительности опухолевых клеток к лизису, опосредуемому Т-клетками, посредством механизмов, зависящих от fas, перфорина или гранзима В.

[000364] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу гипосенсибилизации. Соответственно, согласно настоящему изобретению предусмотрено обеспечение антигенного аллергена пациенту с аллергией. Этот аллерген предпочтительно может быть обеспечен к лангерин⁺ клетке в виде груза в подходящем носителе, определенном в настоящей заявке. Особенно предпочтительно антигенный аллерген обеспечивают более чем в одной дозе. Количество доз и/или концентрация аллергена могут быть увеличены в период лечения. Этот этап обеспечения, который

можно повторять один или несколько раз, как правило, сопровождается размножением и активацией регуляторных Т-клеток, специфичных в отношении антигенного аллергена, что приводит к аллергенспецифичному устранению ЦТЛ, т. е. аллергенспецифичной толерантности в отсутствие костимулирующих сигналов, например, без совместной доставки адьювантов. Применительно к этой схеме лечения аллергены, описанные выше, предпочтительно вводят без совместной доставки какого-либо адьюванта. Также предпочтительно любой костимулирующий сигнал, который приводит к активации лангерин⁺ клеток, ингибируют любыми подходящими способами, известными квалифицированному специалисту. Более подробная информация может быть получена из подходящих литературных источников, таких как Sela et al., 2011, J. Exp. Med., 208, 12, 2489-2496.

[000365] Настоящее изобретение далее будет описано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Клетки Нек293, экспрессирующие лангерин

[000366] Линию клеток эмбриональной почки человека Нек293 поддерживали в среде DMEM с GlutaMax с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (FCS) (Biocrom) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина. Клетки культивировали до 70% конфлюентности и субкультивировали с трипсином каждые 2-3 дня. Если не указано иное, все среды и добавки приобретали у Thermo Fisher Scientific. Клетки выращивали в контролируемых условиях при 37°C и 5% CO₂. Клетки контролировали с помощью светового микроскопа (IT40 5PH, VWR) и культивировали в чашках Петри (Corning). Клетки субкультивировали с протеолитическим ферментом трипсином в комбинации с 0,25% ЭДТА. При обычном субкультивировании все клетки центрифугировали при 500 g в течение 3 мин (Heraeus Megafuge 8R, Thermo Fisher Scientific). Супернатант удаляли путем аспирации, и клетки ресуспендировали в свежей ростовой среде. В качестве контроля качества клетки часто проверяли на отсутствие загрязнения микоплазмами с применением набора для детектирования микоплазм MycoAlert[®] (Lonza). Загрязнение не было обнаружено. Клетки подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток (Eve, Montreal Biotech). Для криоконсервации клеток жизнеспособные клетки подсчитывали, центрифугировали, аспирировали и ресуспендировали в среде для замораживания, состоящей из 90% ростовой среды и 10% ДМСО (категории, подходящей для культивирования клеток, Eugo Clone). Затем криопробирки переносили в контейнер для криопробирок, заполненный

изопропанолом (Mr. Frosty, Nalgene). Контейнер хранили при -80°C по меньшей мере 24 ч, а для длительного хранения флаконы хранили в жидком азоте.

[000367] Клон ORF кДНК лангерина человека приобретали у Sinobiological. Ген клонировали из вектора pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO TA (Life technologies) в вектор экспрессии RP172 (K. J. Koymans et al., Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 and 5 (SSL1 & SSL5) Limit Neutrophil Chemotaxis and Migration through MMP-Inhibition. International journal of molecular sciences 17, 2016) с помощью сборки по Гибсону в соответствии с инструкциями производителя. В общих чертах, фрагменты гена амплифицировали с липким концом из принимающего вектора с помощью ПЦР с применением ДНК-полимеразы высокой точности Phusion (NEB). Для реакции ПЦР готовили исходную смесь, состоящую из 10 мкл буфера Phusion HF (NEB), 5 мкл 2 мМ дНТФ (Carl Roth), 0,5 мкл полимеразы Phusion (NEB) и 29 мкл H₂O на реакцию. К каждой реакции добавляли 0,5 мкл 50 мкМ праймера и 2,5 мкл приблизительно 10 нг/мл векторов-матриц. Принимающий вектор линейаризовали с помощью ПЦР (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf). В данном случае добавляли 0,6 мкл ДМСО (NEB). Качество продуктов ПЦР проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле, а концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoDrop (Implen Nanophotometer).

[000368] В частности, для получения клонов лангерина, клонов варианта лангерина и клонов мышиноного лангерина, а также для получения клонов DC-SIGN и mDectin применяли следующие последовательности праймеров и условия ПЦР:

Название	Последовательность (от 5' к 3')	Направление	SEQ ID NO:	Условия ПЦР
Лангерин человека pcDNA3.1 (+)	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAGCATG ACTGTGGAGAAGG AGGCC	прямой праймер	17	62°C/30 с/35
Лангерин человека pcDNA3.1 (+)	CTAGACTCGAGCG GCCTCACGGTTCT GATGGGAC	обратный праймер	18	62°C/30 с/35
Лангерин человека Плазмидный остов pcDNA3.1 (+)	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	19	59°C/2,5 мин/20
Лангерин человека	GGCCGCTCGAGTC	обратный	20	59°C/2,5

Плазмидный остов pcDNA3.1 (+)	TAGAG	праймер		мин/20
Лангерин человека pcDNA5	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAGCATG ACTGTGGAGAAGG AGGCC	прямой праймер	21	59°C/1 мин/35
Лангерин человека pcDNA5	GTGATGGTGATGA TGA CTCACGGTTC TGATGGGAC	обратный праймер	22	59°C/1 мин/35
Лангерин человека Плазмидный остов pcDNA5	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	23	62°C/3,5 мин/20
Лангерин человека Плазмидный остов pcDNA5	GTCATCATCACCA TCACC	обратный праймер	24	62°C/3,5 мин/20
Лангерин человека RP172	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAG	прямой праймер	25	60°C/1 мин/35
Лангерин человека RP172	CAATGGTGATGGT GATGATG	обратный праймер	26	60°C/1 мин/35
Лангерин человека Плазмидный остов RP172	GAGCTAGCAGtATT AATTAACCACCCT GGCTAGCGTTTAA ACTTAAG	прямой праймер	27	60°C/3,5 мин/20
Лангерин человека Плазмидный остов RP172	GTACCGGTTAGGA TGCATGCCAATGG TGATGGTGATGAT G	обратный праймер	28	60°C/3,5 мин/20
Лангерин человека Остов SNP	GAGCTAGCAGtAT TAATTAACCACCA TGA CTGTGGAGAA GGAG	прямой праймер	34	

Лангерин человека- FLAG Остов SNP	ACGTTTCTTTTCAT TTGTAAGCGACCC TATGTCCCATCAG AACCGGACTACAA AGACGATGACGAC AAGTGAGCATGCA TCCTAACCGGTAC	обратный праймер	35	
N288D	CCAGGTGAGCCCA ACgATGCTGGGAA CAATGAACACTG	прямой праймер	36	
N288D	CATTGTTCCCAGC ATcGTTGGGCTCA CCTGGAATCCAG	обратный праймер	37	
K313I	GTACCGGTTAGGA TGCATGCTCACGG TTCTGATGGGACA TAGGGTCGCTTAC AAATGAAAAGAA ACGTTaTGTCACA TGGGGCATCATTC CAG	прямой праймер	38	
K313I	GAGCTAGCAGtAT TAATTAACCACCA TGACTGTGGAGAA GGAG	обратный праймер	39	
DC-SIGN pcDNA3.1 (+)	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAGCATG AGTGACTCCAAGG AACCAAG	прямой праймер	40	62°C/30 с/35
DC-SIGN pcDNA3.1 (+)	CTAGACTCGAGCG	обратный	41	62°C/30 с/35

	GCCCTACGCAGGA GGGGG	праймер		
DC-SIGN Плазмидный остов pсDNA3.1 (+)	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	42	59°C/2,5 мин/20
DC-SIGN Плазмидный остов pсDNA3.1 (+)	GGCCGCTCGAGTC TAGAG	обратный праймер	43	59°C/2,5 мин/20
DC-SIGN pсDNA5	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAGCATG AGTGA CTCCAAGG AACCAAG	прямой праймер	44	59°C/1 мин/35
DC-SIGN pсDNA5	GTGATGGTGATGA TGACCTACGCAGG AGGGGGGTT	обратный праймер	45	59°C/1 мин/35
DC-SIGN Плазмидный остов pсDNA5	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	46	62°C/3,5 мин/20
DC-SIGN Плазмидный остов pсDNA5	GTCATCATCACCA TCACC	обратный праймер	47	62°C/3,5 мин/20
DC-SIGN RP172	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAG	прямой праймер	48	60°C/1 мин/35
DC-SIGN RP172	CAATGGTGATGGT GATGATG	обратный праймер	49	60°C/1 мин/35
DC-SIGN Плазмидный остов	GAGCTAGCAGTAT TAATTAACCACCC	прямой праймер	50	60°C/3,5 мин/20

RP172	TGGCTAGCGTTT AACTTAAG			
DC-SIGN Плазмидный остов RP172	GTACCGGTTAGGA TGCATGCCAATGG TGATGGTGATGAT G	обратный праймер	51	60°C/3,5 мин/20
Мышиный лангерин pcDNA3.1 (+)	CTGGCTAGCGTTT AACTTAAGCATG CCAGAGGCAGAG ATGAAG	прямой праймер	57	62°C/30 с/35
Мышиный лангерин pcDNA3.1 (+)	CTAGACTCGAGCG GCCTCATTCAGTT GTTTGGACG	обратный праймер	58	62°C/30 с/35
Мышиный лангерин Плазмидный остов pcDNA3.1 (+)	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	59	59°C/2,5 мин/20
Мышиный лангерин Плазмидный остов pcDNA3.1 (+)	GGCCGCTCGAGTC TAGAG	обратный праймер	60	59°C/2,5 мин/20
Мышиный лангерин pcDNA5	CTGGCTAGCGTTT AACTTAAGCATG CCAGAGGCAGAG ATGAAG	прямой праймер	61	59°C/1 мин/35
Мышиный лангерин pcDNA5	GTGATGGTGATGA TGACTCATTCAGT TGTTTGGACG	обратный праймер	62	59°C/1 мин/35
Мышиный лангерин Плазмидный остов pcDNA5	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	63	62°C/3,5 мин/20
Мышиный лангерин	GTCATCATCACCA	обратный	64	62°C/3,5

Плазмидный остов pcDNA5	TCACC	праймер		мин/20
Мышиный лангерин RP172	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAG	прямой праймер	65	60°C/1 мин/35
Мышиный лангерин RP172	CAATGGTGATGGT GATGATG	обратный праймер	66	60°C/1 мин/35
Мышиный лангерин Плазмидный остов RP172	GAGCTAGCAGTAT TAATTAACCACCC TGGCTAGCGTTTA AACTTAAG	прямой праймер	67	60°C/3,5 мин/20
Мышиный лангерин Плазмидный остов RP172	GTACCGGTTAGGA TGCATGCCAATGG TGATGGTGATGAT G	обратный праймер	68	60°C/3,5 мин/20
mDectin-1 pcDNA3.1 (+)	TAGCGTTTAAACT TAAGCATGAAATA TCACTCTCATATA GAGAATC	прямой праймер	69	62°C/30 с/35
mDectin-1 pcDNA3.1 (+)	TAGACTCGAGCGG CCTTACAGTTCCT TCTCACAGATAC	обратный праймер	70	62°C/30 с/35
mDectin-1 Плазмидный остов pcDNA3.1 (+)	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	71	59°C/2,5 мин/20
mDectin-1 Плазмидный остов pcDNA3.1 (+)	GGCCGCTCGAGTC TAGAG	обратный праймер	72	59°C/2,5 мин/20
mDectin-1 pcDNA5	TAGCGTTTAAACT	прямой	73	59°C/1

	TAAGCATGAAATA TCACTCTCATATA GAGAATC	праймер		мин/35
mDectin-1 pcDNA5	GTGATGGTGATGA TGACTTACAGTTC CTTCTCACAGATA C	обратный праймер	74	59°C/1 мин/35
mDectin-1 Плазмидный остов pcDNA5	GCTTAAGTTTAAA CGCTAGCC	прямой праймер	75	62°C/3,5 мин/20
mDectin-1 Плазмидный остов pcDNA5	GTCATCATCACCA TCACC	обратный праймер	76	62°C/3,5 мин/20
mDectin-1 RP172	CTGGCTAGCGTTT AAACTTAAG	прямой праймер	77	60°C/1 мин/35
mDectin-1 RP172	CAATGGTGATGGT GATGATG	обратный праймер	78	60°C/1 мин/35
mDectin-1 Плазмидный остов RP172	GAGCTAGCAGTAT TAATTAACCACCC TGGCTAGCGTTTA AACTTAAG	прямой праймер	79	60°C/3,5 мин/20
mDectin-1 Плазмидный остов RP172	GTACCGGTTAGGA TGCATGCCAATGG TGATGGTGATGAT G	обратный праймер	80	60°C/3,5 мин/20

[000369] Наконец, продукты ПЦР собирали с помощью сборки по Гибсону. Равные объемы (2-10 мкл) ДНК, содержащие 0,02-0,5 пмоль фрагментов ДНК с 2-3 избытком вставки, и исходную смесь для сборки по Гибсону инкубировали при 50°C в течение 20 мин. Исходная смесь содержала экзонуклеазы T5, ДНК-полимеразы Phusion и ДНК-

лигазы Taq для создания одноцепочечных липких концов ДНК, для встраивания нуклеотидов в пропуски ДНК и ренатурации комплементарных фрагментов ДНК. После сборки по Гибсону добавляли 1 мкл DpnI (NEB), чтобы расщепить данный вектор для клонирования. Затем расщепленную реакцию ПЦР (1 мкл) трансформировали в 10 мкл 5-альфа-компетентных *E. coli* (NEB) путем трансформации с помощью теплового шока при 42°C в течение 30 с. Через 2-3 мин на льду, 200 мкл среды SOC (среда SOB, содержащая 20 мМ глюкозы, Carl Roth) добавляли в реакционные сосуды и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Клетки *E. coli* высевали на чашки с агаром LB (Luria/Miller, Carl Roth), содержащие 100 мкг/мл ампициллина (Panreac AppliChem), и инкубировали при 37°C в течение ночи. Для выделения ДНК использовали набор для мелкомасштабного выделения, следуя инструкциям производителя (набор для мелкомасштабного выделения плазмиды GeneJET, Thermo Fisher Scientific). Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoDrop, и плазмидную ДНК секвенировали.

[000370] Лентивирус, применяемый для трансдукции линий клеток, нарабатывали в клетках 293Т с применением реагента для липополиплексной трансфекции (LT) Mirus LT1 (Sopachem). С помощью этой системы вектор RP172 (BIC-PGK-Zeo-T2a-mAmetrine; EF1A), содержащий последовательность лангерина, и упаковывающую смесь, содержащую все три необходимые плазмиды (pVSV-G, pMDL и pRSV), вводили в клетки 293Т. После трансфекции системой LT клетки 293Т продуцировали вирус в течение 3-4 дней, который собирали и замораживали при -80°C, чтобы уничтожить оставшиеся клетки 293Т. Затем этот супернатант применяли для трансдукции лангерин/RP172 в различные клеточные линии.

[000371] Супернатанты, содержащие лентивирус, смешивали с клетками Raji и осторожно центрифугировали в полных средах, содержащих полибрен (Santa Cruz Biotechnology), при 33°C. Вектор RP172 (BIC-PGK-Zeo-T2a-mAmetrine; EF1A) содержит кассету устойчивости к зеоцину и флуоресцентный белок mAmetrine, происходящий из GFP. Трансдукцию 50000 клеток Raji облегчали с помощью инфекции путем центрифугирования при 1000*g в течение приблизительно 90 мин при температуре 33°C. Через 2-3 дня (частично) инфицированные клетки подвергали воздействию зеоцина (Life technologies) для отбора клеток, содержащих RP172. Трансдуцированные клетки отбирали с применением селективной среды, содержащей 300 мкг/мл зеоцина (Life technologies), в течение двух недель. Присутствие RP172 оценивают по экспрессии mAmetrine, измеренной с помощью FACS (BD FACS canto II). Первоначальная проверка mAmetrine (выполняемая перед отбором) имеет решающее значение, поскольку процент

инфицированных клеток определяет титр лентивируса. При всех трансдукциях целевым являлось начальное процентное содержание mAmetrine 5-10%.

[000372] Рекомбинантно экспрессируемые рецепторы детектировали с помощью CLR-специфичных антител. Для окрашивания антителами 50000 клеток инкубировали с 25 мкл среды, содержащей ФЭ-конъюгированное антитело к CD207 мыши/человека в разведении 1:100 (4C7, Biolegend) для окрашивания мышинового лангерина, ФЭ-конъюгированное антитело к CD209 человека (9E9A8, Biolegend) для окрашивания DC-SIGN, ФЭ-конъюгированное антитело к мышинному Dectin-1 (bglfpj, eBioscience) для окрашивания mDectin-1 в клетках или ФЭ-конъюгированное антитело к мышинному IgG2a (RMG2a-62, Biolegend), или ФЭ-конъюгированное антитело к нормальному мышинному IgG1 (sc-2866, Santa CruzBiotechnology) для изотипического окрашивания. Для окрашивания экспрессии на клеточной поверхности клеток, экспрессирующих лангерин человека, 50000 клеток инкубировали с ФЭ-конъюгированным антителом к CD207 в разведении 1:5 (DCGM4, Beckman Coulter). После инкубации при 4°C в течение 30 мин клетки промывали, и окрашивание ФЭ анализировали с помощью проточной цитометрии с помощью лазера 488 с фильтром 574/26 (Attune Nxt, life technologies). На Фигуре 1 показаны результаты.

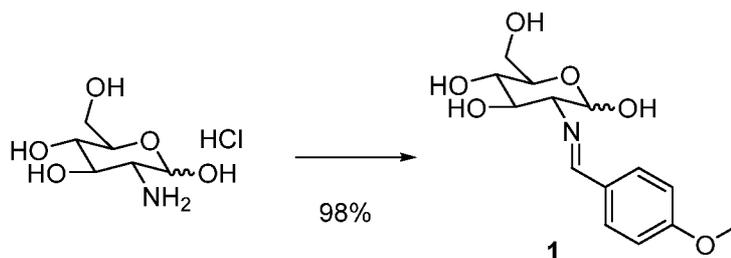
Пример 2

CLR-экспрессирующие клетки Raji

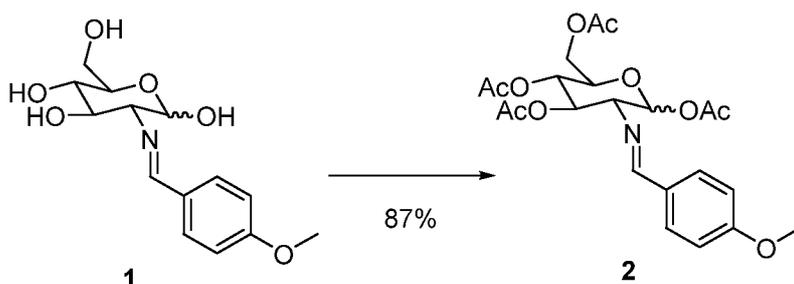
[000373] Линию клеток человека Raji гемопоэтического происхождения выращивали в основной среде RPMI, содержащей 10% FCS, 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина и GlutaMax. Клетки поддерживали в диапазоне 0,5-3 млн. клеток/мл путем добавления или замены полной ростовой среды и выращивали, поддерживали, контролировали и хранили в тех же условиях, как и для Нек293 (см. выше). Клоны ORF кДНК DC-SIGN и мышинового Dectin-1 также переносили из вектора pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO TA (Life technologies) в вектор RP172 (Koymans et al., 2016, Int. J. Mol. Sci., 17, 7, 1072) для стабильной экспрессии в клетках Raji с помощью трансдукции. Клонирование выполняли с применением сборки по Гибсону в соответствии с инструкциями производителя (см. выше). Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoDrop, и плазмидную ДНК секвенировали. Трансдукцию лангерина человека, DC-SIGN и мышинового Dectin-1 в линии клеток Raji проводили, как описано для клеток Нек293 (см. Пример 1). Рекомбинантно экспрессируемые рецепторы детектировали с помощью CLR-специфичных антител и измеряли с помощью проточной цитометрии (см. Пример 1 и Фигуру 2). В совокупности эти экспериментальные результаты описывают рекомбинантные линии клеток, применяемые в настоящей заявке.

Пример 3

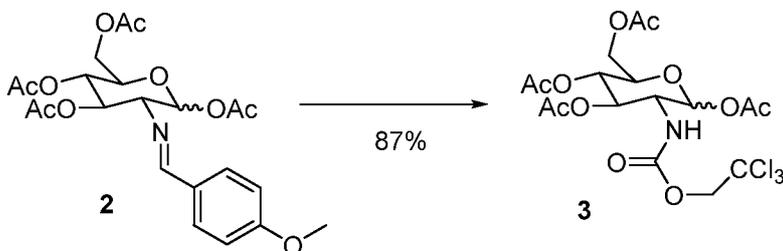
Синтез нацеливающего лиганда



[000374] Гидрохлорид глюкозамина (46,4 ммоль, 10 г) растворяли в водном растворе NaOH (1 М, 47 мл) при 0°C. Пара-анисальдегид (47 ммоль, 5,7 мл) добавляли по каплям в течение 5 минут, и реакционную смесь оставляли перемешиваться при 0°C на 2 ч, в течение которых раствор затвердел. Кристаллическую суспензию фильтровали путем аспирации, промывали H₂O и небольшими количествами Et₂O и высушивали в условиях сильного вакуума при 45°C с получением **1** в виде бесцветного твердого вещества с выходом 97% (45,34 ммоль, 13,48 г).

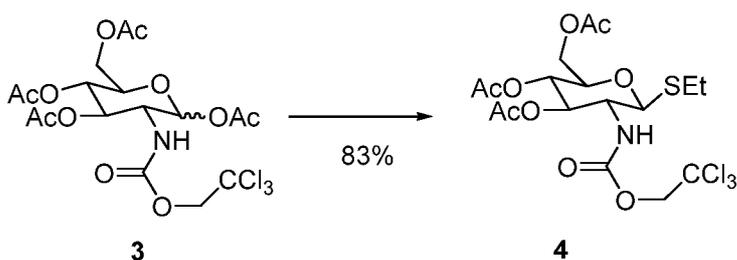


[000375] **1** (40,3 ммоль, 11,98 г) растворяли в пиридине (71 мл) в атмосфере аргона и охлаждали до 0°C. Добавляли уксусный ангидрид (36 мл) при перемешивании, охлаждающую баню удаляли, и смеси давали нагреться до комнатной температуры при перемешивании в течение ночи. Смесь выливали в ледяную воду (240 мл). Полученный осадок фильтровали путем аспирации, промывали водой (350 мл) и высушивали в условиях сильного вакуума с получением **2** в виде бесцветного твердого вещества с выходом 87% (35,15 ммоль, 16,36 г).

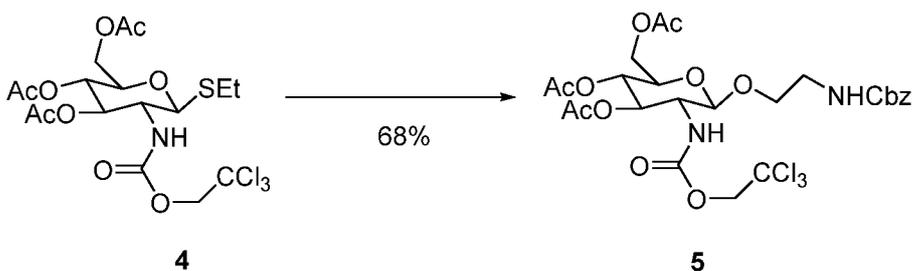


[000376] **2** (35,15 ммоль, 16,36 г) интенсивно перемешивали в кипящем ацетоне в химическом стакане (кипение 70 мл). Быстро добавляли 7,03 мл (35 ммоль) водной HCl (5 М). Немедленно затвердевающей массе давали остыть до комнатной температуры, затем

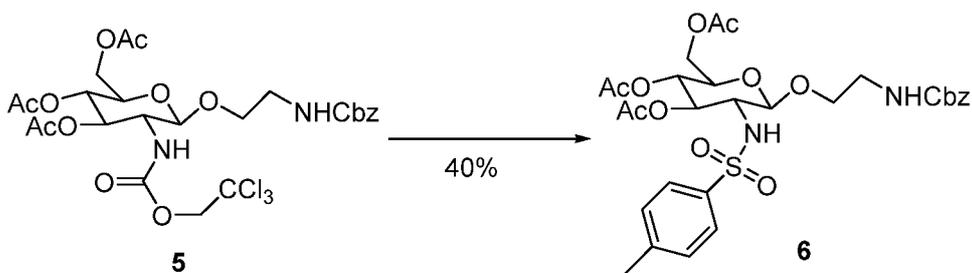
фильтровали путем аспирации, промывали холодным Et₂O и высушивали под вакуумом. Полученное твердое вещество (35,15 ммоль, 11,67 г) суспендировали в 180 мл пиридина и охлаждали до 0°C при сильном перемешивании. К смеси сразу добавляли 2,2,2-трихлорэтилхлорформиат (76 ммоль, 10,4 мл) и оставляли перемешиваться 3 часа. Для нейтрализации избытка Тгос-Cl добавляли 30 мл метанола, а затем смесь концентрировали под вакуумом. Добавляли 250 мл ДХМ, образовавшийся осадок отфильтровывали, а фильтрат концентрировали под вакуумом. Остаток повторно растворяли в небольшом количестве ДХМ и очищали с помощью жидкостной хроматографии с получением 3 в виде бесцветного твердого вещества с выходом 87% (30,61 ммоль, 16 г).



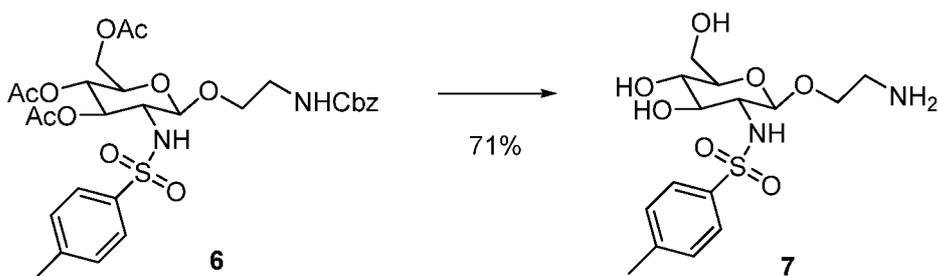
[000377] 3 (13,32 ммоль, 6,96 г) и этантиол (18,64 ммоль, 1,38 мл) растворяли в 35 мл безводного ДХМ в атмосфере аргона и охлаждали до 0°C. BF₃•Et₂O (18,64 ммоль, 2,36 мл) добавляли в течение 5 минут, и реакционную смесь перемешивали в течение 40 минут при 0°C, а затем при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакцию нейтрализовали добавлением 1,1 мл NEt₃, и смесь концентрировали под вакуумом. Очистку проводили с помощью жидкостной хроматографии и получали 4 в виде белого твердого вещества с выходом 83% (11,05 ммоль, 5,8 г).



[000378] Суспензию 4 (2,48 ммоль, 1,30 г) и бензил-2-гидроксиэтилкарбамата (3,96 ммоль, 790 мг) в 60 мл безводного ДХМ перемешивали в течение 45 минут в атмосфере Ar. Добавляли тетрафторборат диметил(метилтио)сульфония (4,95 ммоль, 1 г), и реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи при комнатной температуре. Растворитель удаляли под вакуумом, а остаток очищали с помощью жидкостной хроматографии с получением 5 в виде белого твердого вещества с выходом 68% (1,67 ммоль, 1,1 г).



[000379] Суспензию 5 (0,76 ммоль, 500 мг) и свежее активированного цинка (6,46 г, 99 ммоль) в 27 мл уксусной кислоты перемешивали в течение 4 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит и высушивали под сильным вакуумом в течение ночи. Полученное твердое вещество затем растворяли в пиридине (12 мл) и по каплям добавляли хлорид *p*-толуолсульфонила (1,52 ммоль, 290 мг; растворенный в 12 мл пиридина). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Затем растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью жидкостной хроматографии с получением 6 в виде белого порошка с выходом 43% (209 мг, 0,33 ммоль).



[000380] К раствору 6 (0,30 ммоль, 190 мг) в безводном метаноле (8 мл) добавляли раствор метанолата натрия ($c=0,5$ мМ, 149 ммоль, 2,98 мл) в атмосфере Ag и оставляли для перемешивания в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Полученный белый порошок повторно растворяли в безводном метаноле (30 мл), добавляли 30 мг палладия на угле (10%), и реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере водорода в течение ночи. Катализатор отфильтровывали через целит и промывали метанолом. Растворители удаляли, а остаток очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой с получением 7 в виде белого твердого вещества с выходом 71% (0,21 ммоль, 80 мг).

Пример 4

Конъюгация липидов

[000381] Лиганды и красители связывали с PEG-DSPE с помощью NHS-конъюгации. Сложный эфир NHS Alexa Fluor 647 (A647, Life technologies) конъюгировали с первичным амином NH₂-PEG-DSPE (ПЭГ с мол. массой 2000, Sunbright) за счет амидного связывания. Липид (1,024 мг), растворенный в 500 мкл ДМСО, перемешивали в

грушевидной колбе, и к липиду по каплям добавляли 1 мг красителя (1,5 экв.), растворенного в 500 мкл ДМСО. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи в темноте при комнатной температуре. ДМСО подвергали сублимационной сушке (Alpha 2-4 LDplus, CHRIST), и продукт реакции растворяли в 2-3 мл буфера, содержащего 0,1 М бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich), при pH=8,4. Неконъюгированный краситель удаляли с помощью диализа с использованием кассеты Slide-A-Lyzer (7 NOMM, 0,5-3 мл, Thermo Fisher Scientific) сначала против 500 мл буфера в течение нескольких часов с двукратной заменой буфера, а также инкубацией в течение ночи, а затем подвергали диализу еще три раза против воды, при этом по меньшей мере 1 ч диализа проводили при постоянном перемешивании. Воду удаляли с помощью сублимационной сушки, а конечный продукт растворяли в ДМСО в концентрации 8 мг/мл. Гликомиметический лиганд лангерина, манноза, а также полимеры маннозы содержали концевой первичный амин и были связаны с NHS-PEG-DSPE (ПЭГ с мол. массой 2000, NOF Europe) за счет амидного связывания аналогичным способом, как описано для конъюгации A647, за исключением того, что 2 мг лигандов растворяли в 900 мкл буфера и 0,125 эквивалента липидов растворяли в 100 мкл ДМФ. Липиды добавляли по каплям в грушевидную колбу, и ДМФ удаляли под вакуумом (Heidolph). Конечный продукт растворяли в ДМСО-d6 (Euriso-Top), и эффективность конъюгации определяли с помощью H^1 -протонной ЯМР-спектроскопии с 265 сканированиями (400 МГц, Variant).

Пример 5

Изготовление липосом

[000382] Нацеленные и непокрытые пегилированные липосомы получали с помощью метода гидратации пленки с последующей экструзией (Chen et al., 2010, Blood, 115, 23, 4778-4786). Если не указано иное, липосомы содержали DSPE:холестерин:лиганд-PEG-DSPE/PEG-DSPE:краситель-PEG-DSPE в мольном соотношении 57:38:4,75:0,25. Если липосомы содержали менее 4,75 мол.% липидов, конъюгированных с лигандом, то липосомы заполняли PEG-DSPE, чтобы всегда получать общее мольное соотношение 5% пегилированных липидов. Пегилированные липиды растворяли в ДМСО в концентрации 8 мг/мл и хранили при $-20^{\circ}C$ для длительного хранения. DSPE (NOF Europe) и холестерин (Sigma-Aldrich) всегда были свежеприготовленными, и их растворяли в хлороформе в концентрации 20 мг/мл и 10 мг/мл, соответственно. Пегилированные липиды добавляли в стеклянную пробирку, и ДМСО подвергали сублимационной сушке. Затем добавляли DSPE и холестерин, а хлороформ удаляли под вакуумом в течение ночи. Сухую липидную пленку гидратировали DPBS (без кальция и магния; Life technologies) в концентрации 1,6 мМ, если не указано иное. Раствор, содержащий липиды, сначала встряхивали, а затем

обрабатывали ультразвуком (Ultrabath 1510, Branson) в течение 3 секунд с тремя повторами и коротким промежутком времени между ними. Этот этап повторяли до получения гомогенной суспензии. Большие однослойные липосомы получали путем экструзии через поры (экструдер, Avanti Polar Lipids), используя 30 ходов сначала с поликарбонатной мембраной 200 нм, а затем 100 нм (Avanti Polar Lipids). Концентрация липосом относится к общей концентрации липидов.

Пример 6

Характеристика липосом

[000383] Чтобы охарактеризовать липосомы, полученные в соответствии с процедурой, описанной в Примере 4, в отношении размера и стабильности частиц, измерения динамического рассеяния света (Malvern Instruments Zetasizer) осуществляли на разбавленных растворах липосом (32 мкМ в чистой воде). Липосомы, проявляющие дзета-потенциалы от -35 мВ до -15 мВ, а также средний размер частиц от 100 до 200 нм (график интенсивности в %) и индексы полидисперсности до 0,3, рассматривали как целесообразные для дальнейшего применения.

Пример 7

Загрузка и очистка липосом

[000384] Несколько белков были разработаны в качестве груза для загрузки липосом. Ниже представлена рекомбинантная экспрессия этих белков и описана их загрузка в липосомы.

[000385] 2 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА) (PAA) растворяли в 1 мл буфера HBSS (Life technologies) и переносили в грушевидную колбу объемом 5 мл с перегородкой и стержнем для перемешивания. Изотиоцианат флуоресцеина (Thermo Fisher Scientific) растворяли в ДМСО (1 мг/мл) и медленно добавляли 200 мкл с шагом 5 мкл к БСА. Колбу накрыли алюминиевой фольгой и осуществляли перемешивание в течение ночи при комнатной температуре. Реакцию нейтрализовали путем добавления этаноламина в конечной концентрации 50 мМ (Sigma-Aldrich) и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Неконъюгированный флуоресцеин удаляли с помощью диализа с использованием кассеты Slide-A-Lyzer (7 НОММ, 0,5-3 мл, Thermo Fisher Scientific) против буфера HBS (25 мМ HEPES, Carl Roth; 150 мМ NaCl, Panreac AppliChem; pH=7,5). Буфер дважды меняли после 1 ч перемешивания и после еще одной инкубации в течение ночи. Концентрацию белков, конъюгированных с FITC, измеряли на основании поглощения при 280 нм, а эффективность конъюгации определяли при 495 нм с помощью NanoDrop (Implen Nanophotometer). Образцы белка хранили при 4°C.

[000386] Липосомы загружали FITC-БСА путем гидратации тонкой пленки липида с применением DPBS, содержащего FITC-БСА. Концентрации FITC-БСА варьировались от 1 мг/мл до 20 мг/мл. После обработки ультразвуком и экструзии через поры липосомы очищали с помощью ультрацентрифугирования или гель-проникающей хроматографии. Для удаления свободных белков с помощью ультрацентрифугирования суспензию липосом переносили в пробирку для ультрацентрифугирования (Thinwall, Ultra-Clear™, 4 мл, Beckman coulter). Пробирку заполняли DPBS, чтобы предотвратить схлопывание. Липосомы ультрацентрифугировали при 55000 об./мин в течение 1 ч при 4°C, используя ротор SW 60 Ti (Beckman coulter) в ультрацентрифуге (ультрацентрифуга Optima L-80 XP, Beckman Coulter). Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в DPBS. Ультрацентрифугирование повторяли дважды. Очистку с помощью гель-проникающей хроматографии выполняли с помощью 20 мл сред для гель-фильтрации сефароза-CL (CL-4B, поперечно-сшитая, Sigma-Aldrich), которую упаковывали в хроматографическую колонку (Econo-column, 1,5×30 см, BioRad). Колонку уравнивали DPBS перед загрузкой раствора липосом в колонку. Фракции по 1,5 мл собирали до элюирования липосом и свободного FITC-БСА (10-15 фракций). После фракционирования колонку восстанавливали с помощью буфера для восстановления, содержащего 0,5 М NaCl в 0,1 М NaOH, уравнивали DPBS до достижения нейтрального pH, и следующий раствор липосом разделяли с помощью гель-проникающей хроматографии. Эффективность инкапсуляции анализировали с помощью считывающего устройства для планшетов (SpectraMax M5, Molecular Devices) и рассчитывали на основе стандартных кривых. Концентрацию липосом измеряли с помощью липосом, покрытых Alexa 647 (возбуждение 640, испускание 670), и концентрацию FITC-БСА измеряли при возбуждении 485 и испускании 525. Эффективность инкапсуляции рассчитывали на 1 мМ общей концентрации липидов.

Пример 8

Характеристика липосом

[000387] Дисперсность и стабильность липосом определяли, как описано ранее (см. Примеры 4-6).

[000388] FITC-БСА применяли, чтобы продемонстрировать способы инкапсуляции и очистки белка. Концентрацию общего белка FITC-БСА измеряли после ультрацентрифугирования. Затем очищенные липосомы тестировали в клеточном анализе. Липосомы с инкапсулированным FITC-БСА затем инкубировали с лангерин⁺ клетками Raji в течение 2 ч при 37°C, чтобы индуцировать интернализацию. Флуоресценцию A647 и FITC отдельных клеток измеряли одновременно с помощью проточной цитометрии (см.

Фигуру 3). Как было показано ранее, сигнал флуоресценции Alexa647 детектировали для нацеленных липосом с инкапсулированным FITC-БСА или без него, но, что более важно, сигнал FITC детектировали только для липосом с инкапсулированным FITC-БСА. Сигнал FITC-БСА был значительно повышен в клетках, которые были мишенями инкапсулированных липосом, в то время как непокрытые липосомы с инкапсулированным FITC-БСА не демонстрировали сигнал FITC. Целостность липосом для ультрацентрифугированных липосом анализировали с помощью DLS (см. Фигуру 3 (C)). Размер и дзета-потенциал были сходны таковыми для необработанных липосом (см. Пример 6 и Фигуру 5 (C)) или липосом, очищенных с помощью гель-проникающей хроматографии, что указывает на сохранение структурной целостности. Затем липосомы с инкапсулированным FITC-БСА инкубировали с лангерин⁺ клетками Нек293 в течение 6 ч при 37°C, а затем клетки анализировали с помощью микроскопии после окрашивания ядра (см. Фигуру 3 (D)). Через 6 часов FITC-БСА был в значительной степени колокализован с совместно изготовленным липосомальным красителем А647, что указывает на аналогичные эндосомальные компартменты.

[000389] Чтобы исключить влияние значительных центробежных сил во время ультрацентрифугирования на высвобождение липосомами своего груза в супернатант, что приводит к более низкой эффективности инкапсуляции, липосомы, очищенные с помощью гель-проникающей хроматографии и ультрацентрифугирования, сравнивали в клеточном анализе (см. Фигуру 4). Сигнал FITC-БСА для последнего варианта был даже выше по сравнению с липосомами, очищенными с помощью гель-проникающей хроматографии, это позволяет сделать вывод о том, что центробежные силы не влияли на целостность липосом и что это соответствует наиболее эффективному способу очистки. Следовательно, все последующие липосомы очищали с помощью ультрацентрифугирования, если не указано иное.

[000390] Чтобы проанализировать влияние начальной концентрации FITC-БСА на эффективность инкапсуляции, концентрацию белка варьировали от 20 мг/мл до 1 мг/мл, и инкапсулированные липосомы тестировали в клеточном анализе (см. Фигуру 5 (A)). Сигнал флуоресценции нормировали к совместно изготовленному красителю А647. Самый высокий сигнал флуоресценции детектировали в липосомах, изготовленных с 20 мг/мл FITC-БСА. Однако сигнал флуоресценции не коррелировал с начальной концентрацией белка, используемой для изготовления липосом. Этот результат указывает на то, что в диапазоне от 1 мг/мл до 20 мг/мл эффективность инкапсуляции была в сходном диапазоне и не зависела от начальной концентрации белка.

[000391] Кроме того, варьировали начальную концентрацию липосом. 10 мМ сравнивали с 1 мМ повторно гидратированных липосом в клеточном анализе (см. Фигуру 5). Липосомы повторно гидратировали с применением 20 мг/мл FITC-БСА. Флуоресценция FITC клеток, инкубированных с липосомами с инкапсулированным FITC-БСА, была очень сходной для 10 мМ и 1 мМ изготовленных липосом, это указывает на то, что различные концентрации липосом не влияли на эффективность инкапсуляции. Размер и дзета-потенциал всех липосом анализировали с помощью DLS (см. Фигуру 5 (С)). Кроме того, эффективность инкапсуляции FITC-БСА анализировали с помощью считывающего устройства для планшетов после ультрацентрифугирования и рассчитывали для 1 мМ липосом (Фигура 5 (В)). В данном случае величины эффективности инкапсуляции всех изготовленных липосом также находились в сходном диапазоне от 17 мкг до 95 мкг на 1 мМ липосом и не демонстрировали тенденцию к улучшению эффективности инкапсуляции.

[000392] Затем инкапсулированные липосомы инкубировали в различных дозах и осуществляли кинетическое исследование для детектирования различий между инкапсулированным грузом FITC-БСА и А647-меченым средством для переноса для доставки (см. Фигуру 6). Инкапсулированные FITC-меченые белки измеряли с помощью лазера 488 нм и фильтра 574/26 нм (Attune Nxt, Life technologies). Эти исследования подтвердили результаты на Фигуре 14 (В) и 14 (С), а также продемонстрировали, что при 16 мкМ липосом интернализация не насыщалась через 24 часа, а интернализация липосом при более высоких концентрациях насыщалась при концентрации липосом выше 250 мкМ. Однако, что более важно, инкапсулированный груз FITC-БСА и А647-меченые липосомы показали почти идентичные скорости интернализации в зависимости от дозы и коррелирующие в значительной степени кинетики интернализации, это указывает на то, что груз и средство для переноса для доставки подвергаются сходным путям процессинга, как уже наблюдали с помощью микроскопии на Фигуре 3 (D).

[000393] Эти оптимизированные способы инкапсуляции затем применяли для изготовления липосом, содержащих иммуноактивный белок EBNA1. В качестве модельного пептида выбрали EBNA (ядерный антиген Эпштейна-Барр). Это короткий иммуноактивный пептид вируса Эпштейна-Барр (EBV), который имеет более чем 90% распространенность среди взрослого населения (см. Cohen, 2000, N Engl J Med, 343, 7, 481-492). Помимо этого пептид «домашнего хозяйства» PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) ассоциирован с прогрессированием рака и, как считается, стимулирует уклонение от распознавания иммунной системой (Rosental et al., 2011, J Immunol, 187, 11, 5693-5702). Помимо этого пептид «домашнего хозяйства» PCNA

(ядерный антиген пролиферирующих клеток) ассоциирован с прогрессированием рака и, как считается, стимулирует уклонение от распознавания иммунной системой. Поэтому этот пептид применяли в качестве отрицательного контроля.

Пример 9

Экспрессия бактериального белка и очистка EBNA1 и PCNA

[000394] Клетки EBNA1 BL21 и PCNA BL21 *E. coli* применяли LC (см. Barwell et al., 1995, J Biol Chem, 270, 35, 20556-20559). Белки гибридизуют с His-меткой и сайтом распознавания тромбина. Для экспрессии белка клетки культивировали в 50 мл среды LB (Luria/Miller, Carl Roth) с 200 мкг/мл ампициллина в колбе Эрленмейера объемом 250 мл в течение ночи при 37°C и 300 об./мин (MaxQ 4000, Thermo Fisher Scientific). На следующий день предварительную культуру центрифугировали при 3000 g в течение 12 мин (Multifuge X3R Heraeus, Thermo Scientific Fisher). Осадок ресуспендировали в свежей среде LB. Для инокуляции 500 мл среды с добавлением 200 мкг/мл ампициллина 20 мл предварительной культуры добавляли в колбу Эрленмейера объемом 2000 мл и встряхивали при 300 об./мин при 37°C. Культуру инкубировали до достижения значения оптической плотности (OD при 600 нм) приблизительно 0,8, чтобы индуцировать экспрессию белка с применением 1 mM IPTG для экспрессии в течение ночи при 30°C. На следующий день 500 мл суспензий бактериальных клеток центрифугировали при 4000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в ФСБ, переносили в пробирку объемом 50 мл, снова центрифугировали и конечный осадок *E. coli* либо замораживали при -80°C, либо непосредственно использовали для очистки белка с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки для связывания His-метки (HisTrap HP, 1×1 мл; GE Healthcare).

[000395] Для очистки рекомбинантного экспрессированного белка клетки *E. coli* лизировали с применением 5 мл лизирующего буфера (50 mM Na₂PO₄, Carl Roth; 300 mM NaCl, Panreac AppliChem; 10 mM имидазола, Carl Roth; pH=8) на 1 г осадка *E. coli*. Добавляли 1 мг лизоцима (Fluka) на 1 мл лизата, и клетки инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После этого клетки обрабатывали ультразвуком три раза по 20 секунд при 30% амплитуде и с интервалом в 10 секунд (Branssen, Digital Sonifier). Лизат центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут, и супернатант, содержащий гиперэкспрессированный белок, фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (Corning) для удаления разрушенных клеток.

[000396] Рекомбинантно экспрессированные белки очищали с помощью аффинной хроматографии со связыванием His-метки с применением быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC, MBP 2,1 л Azura, Knauer). FPLC уравнивали

связывающим буфером (в линии А: 50 мМ Na₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, рН=8), промывочным буфером (в линии В: 50 мМ Na₂PO₄, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, рН=8), дистиллированной водой (в линии С) и буфером для элюирования (в линии D: 50 мМ Na₂PO₄, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазола, рН=8). Профильтрованный супернатант, содержащий гиперэкспрессированный белок, впрыскивали в FPLC. Супернатант загружали на колонку his-trap со связывающим буфером при скорости потока 1 мл/мин и максимальном давлении 1 бар в течение 20 минут. Концентрацию белка измеряли при 280 нм с помощью УФ-детектора. Загруженную колонку промывали в течение 20 минут промывочным буфером перед элюированием белка путем применения градиента от промывочного буфера до элюирующего буфера в течение 10 минут. Фракции по 1 мл собирали в небольшие реакционные пробирки. В течение дополнительных 5 минут вносили 100% буфер для элюции для элюирования всего his-захваченного белка. Колонку уравнивали связывающим буфером перед началом следующего цикла. Фракции с his-мечеными белками собирали и объединяли для диализа белков (CelluTrans dialysis, Cral Roth) против буфера HBS (25 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, рН=7,5), содержащего 2 мМ CaCl₂. Качество белка проверяли с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, а концентрацию белка измеряли с помощью NanoDrop (Implen Nanophotometer).

[000397] Пептиды гиперэкспрессировали в *E. coli*, и результаты показаны на Фигуре 7. После лизиса клеток His-гибридизованные пептиды очищали с помощью аффинной колонки со связыванием His-метки (см. Фигуру 7 (А)). Затем для определения качества пептида применяли электрофорез в ДСН-ПААГ (см. Фигуру 7 (В)). Фракции загрузки, протока и промывки использовали для контроля очистки пептида. Затем пептиды PCNA и EBNA метили FITC и инкапсулировали в липосомы.

[000398] Белки загружали, как описано в разделе «Загрузка и очистка липосом», за исключением того, что FITC-конъюгированные белки EBNA расщепляли с применением десятикратного объема трипсина, очищали с помощью гель-проникающей хроматографии и концентрировали с помощью ультрацентрифугирования. Все остальные этапы выполняли в соответствии с протоколом.

[000399] Липосомы анализировали с помощью DLS, и эффективность инкапсуляции определяли с помощью считывающего флуоресценцию устройства для планшетов (см. Фигуру 7 (С)). Размер, дзета-потенциал и эффективность инкапсуляции были в пределах типичного диапазона для предыдущих липосомальных составов (см. Фигуру 5 (С)).

[000400] Затем антигены FITC-PCNA и FITC-EBNA доставляли к LC. Липосомы с инкапсулированным антигеном, нацеленные на LC, окрашивали 56,9% и 84,1% LC с FITC-PCNA и FITC-EBNA, соответственно, в то время как непокрытые липосомы не

демонстрировали повышение флуоресценции FITC. Это демонстрирует специфичную доставку антигенов за счет инкапсулированных липосом.

[000401] В совокупности белки, инкапсулированные в липосомы, могут быть специфично доставлены к лангерин-положительным клеткам.

Пример 10

Клеточный анализ связывания и интернализации липосом

[000402] Специфичность липосом изучали с помощью экспрессии нескольких CLR с перекрывающимися паттернами связывания в модельных линиях клеток и анализа связывания липосом. 50000 клеток Raji высевали в 100 мкл полной ростовой среды, содержащей 16 мкМ липосом. Для измерения связывания липосом планшет инкубировали при 4°C, в то время как интернализацию рецептора индуцировали путем инкубации при 37°C. После инкубации клетки центрифугировали при 500 g в течение 3 мин, и супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в 100 мкл ледяной культуральной среды и анализировали путем детектирования совместно изготовленного красителя Alexa647 с помощью проточной цитометрии с использованием лазера 633 нм и фильтра 570/20 нм (BD FACSCanto II, BD Biosciences) или лазера 654 нм с фильтром 670/14 нм (Attune Nxt, life technologies).

[000403] Как показано на Фигуре 9, непокрытые, конъюгированные с GlcN-тозил и конъюгированные с маннозой липосомы тестировали для определения связывания липосом с клетками дикого типа, экспрессирующими лангерин⁺, мышинный лангерин⁺ (mLangerin⁺), DC-SIGN⁺ и мышинный Dectin-1⁺ (mDectin-1⁺) клетками. Связывание липосом детектировали после инкубации с CLR-экспрессирующими клетками при 4°C. Сигналы флуоресценции липидов, изготовленных совместно с A647, показали значительное связывание GlcN-тозил-функционализированных липосом с лангерин⁺ клетками Raji. Сигнал флуоресценции повышался в 46 раз и был специфичным для лангерин⁺ клеток. Липосомы, функционализированные маннозой, не были способны связывать лангерин⁺ клетки, но значительно связывали DC-SIGN⁺ клетки с 12-кратным повышением флуоресценции. Связывание липосом для различных липосомальных препаратов с функционализированным GlcN-тозил показало систематическое связывание с лангерин⁺ клетками. Связывание липосом дополнительно характеризовали с применением ламинарина, маннана и ЭДТА в качестве конкурентов. Природный лиганд маннан, который связывается с первичным сайтом связывания лангерина и DC-SIGN, полностью устранял связывание липосом с обоими CLR. ЭДТА частично ингибировал связывание GlcN-тозил-функционализированных липосом и полностью предотвращал связывание липосом, конъюгированных с маннозой (см. Фигуру 9 (B)). Следовательно,

липосомы на основе гликомиметиков и основанные на принципе гепарина показали кальций-зависимое специфичное связывание с первичным сайтом связывания лангерина человека.

Пример 11

Интернализация липосом для липосом, функционализированных лигандом лангерина, основанным на принципе гепарина

[000404] До сих пор детектировали специфичное связывание липосом, нацеленных на лангерин, с клетками, экспрессирующими лангерин. Однако для доставки иммуномодулирующих агентов липосомы должны быть интернализированы в клетки; поэтому микроскопические исследования выполняли с нефункционализированными и функционализированными липосомами. Лазерная сканирующая микроскопия (LSM) в комбинации с флуоресцентными белками или синтетическими флуорофорами позволяет детектировать совместную локализацию частиц и клеточных органелл. Клетки культивировали на покровных стеклах (Carl Roth) в 24-луночных планшетах (Corning). Перед посевом клеток покровные стекла покрывали поли-L-лизином (Sigma Aldrich) путем инкубации в течение ночи. После промывки покровных стекол с применением DPBS 200000 клеток Нек293 дикого типа или лангерин⁺ клеток Нек293 высевали в 500 мкл культуральной среды. 24-луночный планшет инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. На следующий день 16 мкМ липосом добавляли на 1 час при 37°C, если не указано иное. После инкубации липосом клетки фиксировали 4% параформальдегидом (Roti-Histofix, Carl Roth) в течение 10 минут, и клеточную мембрану окрашивали 10 мкМ DiO (Thermo Fisher Scientific) в течение 15 минут. Для окрашивания ядра клетки сначала пермеабелизировали 0,1% сапонином (Sigma Aldrich) в течение 10 минут, а затем окрашивали 1 мкг/мл DAPI (Sigma Aldrich) в течение 5 минут. Для длительного хранения покровные стекла фиксировали на предметных стеклах для микроскопа (Carl Roth) с помощью заливочного раствора (Carl Roth). Предметные стекла анализировали с помощью микроскопии (конфокальный микроскоп плоскостного освещения DLS-DMi8, Leica). Интернализацию липосом, нацеленных на лангерин, детектировали путем сканирования различных слоев клеток в фокусе (см. Фигуру 10). Несмотря на то, что липосомы в основном располагались в верхних областях, центральные и нижние слои клеток также демонстрировали сигналы флуоресценции A647, подтверждающие интернализацию липосом.

[000405] Затем взаимодействия рецептор-лиганд исследовали более подробно в отношении кинетики связывания и интернализации липосом, функционализированных в отношении лангерина. Кинетика связывания выявила, что адгезия липосом на лангерин⁺

клетках насыщалась через 4 часа (см. Фигуру 11 (А)). Напротив, кинетику интернализации проводили при 37°C до 24 часов (см. Фигуру 11 (В)). Даже после 24 ч инкубации сигнал флуоресценции А647 не насыщался, что означает высокое поглощение липосом, нацеленных на лангерин. Однако интернализация липосом была ограничена применением более высоких концентраций (см. Фигуру 11 (С)).

[000406] Концентрации, применявшиеся в предыдущих исследованиях (16 мкМ), указаны черной стрелкой на Фигуре 11 (С). Насыщение достигалось при концентрациях выше 250 мкМ. Исследования связывания, поглощения и концентрации нельзя было напрямую сравнивать, поскольку мощность лазера адаптировали для каждого измерения. Во всех экспериментах не наблюдали связывание с клетками Raji дикого типа (сплошные черные линии).

[000407] Для визуализации и подтверждения высоких скоростей поглощения липосом выполняли микроскопические исследования. Нацеленные липосомы инкубировали с лангерин⁺ клетками Нек293 в течение различных периодов времени до 48 часов (см. Фигуру 12). Интернализацию липосом наблюдали уже через 30 мин.

[000408] Через 24 ч липосомы накапливались настолько сильно, что сигнал А647 был полностью перенасыщен. Поэтому напряжение ФЭУ уменьшали, что видно на правой панели. Клетки Нек293 дикого типа не демонстрировали детектируемый сигнал флуоресценции А647 липидов через 48 ч даже при высоких показателях ФЭУ.

[000409] В совокупности было показано, что специфичное связывание и поглощение нацеленных липосом линиями клеток, экспрессирующих лангерин, зависит от дозы и времени.

Пример 12

Нацеленная доставка к модельным линиям клеток: плотность лиганда в мол. %

[000410] Детектировали зависимость сигнала флуоресценции от мольного соотношения лиганда, демонстрирующую взаимосвязь между концентрацией нацеливающего лиганда и эффективностью связывания с лангерин⁺ клетками (см. Фигуру 13).

[000411] Липосомальные составы с различными мольными соотношениями также инкубировали в зависимости от дозы и времени (см. Фигуру 14).

Пример 13

Перемещение липосом и доставка антигена за счет липосом, нацеленных на лангерин

[000412] Исход презентации антигена на ГКГСИ или ГКГСII в значительной степени зависит от внутриклеточных путей процессинга. Таким образом, перемещение липосом

анализировали с помощью эндосомальных маркеров. Локализацию липосом исследовали с помощью микроскопии через 2 ч инкубации липосом с иммуноокрашиванием против Rab5, Rab7, Rab11, EEA1 и Lamp-1 (см. Фигуру 15). На Фигуре 15 (А) совместную локализацию можно наблюдать в результате наложения обоих каналов со средней интенсивностью серого на один ярко-серый тон. Большинство перекрывающихся сигналов флуоресценции, возникающих из-за близкого соседства или одинакового расположения липосом, детектировали с помощью маркера поздних эндосом/лизосом Lamp-1.

[000413] Меньшую совместную локализацию, по сравнению с Lamp-1, детектировали для маркеров ранних эндосом EEA1 и Rab5, а также для маркера рециклирования Rab11. В заключение, после 2 ч инкубации липосом большая часть нацеленных на лангерин средств для переноса была локализована в поздних эндосомах и лизосомах. Однако липосомы были совместно локализованы с маркерами ранних эндосом EEA1 и Rab5 в более ранних временных точках 2 мин и 20 мин (см. Фигуру 16).

[000414] В совокупности эти данные демонстрируют, что нацеленные липосомы поглощаются в линии лангерин-положительных клеток и следуют по внутриклеточному пути перемещения в эндосомальном компартменте, начиная с ранней эндосомы (2-20 мин), а затем перемещаются в поздний эндосомальный и лизосомальный компартменты (60-120 мин).

Пример 14

Цитотоксичность *in vitro* нацеленных на лангерин липосом, основанных на принципе гепарина

[000415] Липосомы состоят в основном из фосфолипидов и холестерина. Эти природные и биосовместимые соединения показали высокую безопасность липосом в клинических исследованиях (Immordino et al., 2006, Int J Nanomedicine 1, 3, 297-315). Тем не менее, более длительные инкубационные периоды и высокие концентрации функционализированных липосом могут привести к цитотоксическим эффектам. Чтобы исключить токсичность, индуцированную флуоресцентным красителем и гликомиметическим лигандом лангерина, выполняли анализы токсичности. Для анализа цитотоксических эффектов, индуцированных липосомами, клетки окрашивали аннексином-V и 7-AAD. Для анализа раннего и позднего апоптоза 10000 клеток инкубировали с различными концентрациями липосом в 50 мкл в течение 24 ч или 16 мкМ липосом инкубировали в течение различных периодов времени при 37°C и 5% CO₂. В качестве положительного контроля клетки обрабатывали в течение 3 мин 50% ДМСО. Необработанные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки

промывали и ресуспендировали в 25 мкл буфера (10 мМ HEPES, 140 мМ NaCl и 2,5 мМ CaCl₂, pH=7,4), содержащего аннексин-V-FITC, разведенный в соотношении 1:100 (Adipogen). Клетки инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре. После промывки клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера, содержащего 1 мкл раствора 7-AAD (Biolegend), и инкубировали в течение 5-10 мин в темноте при комнатной температуре. Клетки измеряли непосредственно без каких-либо дополнительных этапов промывки с помощью проточной цитометрии. Аннексин-V и 7-AAD возбуждали лазером 488, Alexa647 возбуждали лазером 654. Аннексин-V детектировали с помощью фильтра 530/30, 7-AAD детектировали с помощью фильтра 695/40 и Alexa647 детектировали с помощью фильтра 670/14 (Attune Nxt, life technologies). Спектральные перекрытия компенсировали. Липосомы, нацеленные на лангерин, инкубировали с клетками в течение длительных периодов времени до 72 ч, а затем анализировали клеточную токсичность (см. Фигуру 17).

[000416] Ранние апоптотические эффекты детектировали с применением окрашивания аннексином-V, который связывает транслоцированный фосфатидилсерин, в то время как поздние апоптотические клетки окрашивали 7-AAD, не проникающим в клетки флуоресцентным интеркалятором, который ассоциируется с ДНК и претерпевает спектральный сдвиг. Однако 7-AAD может проникать через мембраны мертвых клеток. Разрушенные клетки не учитывали при гейтировании живых и мертвых клеток на графике FSC-A/SSC-A. После распознавания дублетов анализировали окрашивание отдельных клеток аннексином-V-FITC и 7-AAD на гистограмме с двумя переменными путем разделения графика на четыре квадранта. Необработанные, обработанные ДМСО и обработанные липосомами клетки представлены в качестве примера на Фигуре 17 (А). Используя аналогичную стратегию гейтирования, повтор исходного элемента (FoP) всех четырех квадрантов анализировали в образцах, которые инкубировали в течение различных периодов времени. FoP двойных отрицательных клеток (живые клетки), аннексин-V⁺ клеток (ранние апоптотические клетки) и 7-AAD, а также двойных положительных клеток (поздние апоптотические клетки) визуализировали на графике со сгруппированными столбиками (см. Фигуру 17 (В)). Необработанные клетки, представляющие отрицательный контроль, показали более 90% жизнеспособных клеток. С другой стороны, клетки, обработанные ДМСО (50% ДМСО в течение 3 мин), применявшиеся в качестве положительного контроля, показали 98% мертвых клеток. Таким образом, контрольные образцы представляют собой функциональный анализ. Даже длительные периоды времени, до 72 ч, не выявили признаки каких-либо цитотоксических эффектов, индуцированных липосомами. Кроме того, интернализацию липосом

контролировали с помощью анализа флуоресценции липида, изготовленного совместно с А647 (см. Фигуру 17 (С)). Сходно с предыдущими результатами не детектировали насыщение интернализации липосом после 24 ч (в сравнении с Фигурой 14). Однако интернализация липосом насыщалась через 48-72 ч. Примечательно, что 10000 клеток высевали всего лишь в 50 мкл ростовой среды.

[000417] Исследование зависимости токсичности от дозы выполняли аналогично исследованию кинетики (см. Фигуру 18). Стратегия гейтирования и контрольные образцы были идентичны таковым в предыдущем исследовании токсичности (см. Фигуру 17). В данном случае концентрации липосом от 1 мкМ до 1 мМ инкубировали в течение 24 ч. После инкубации токсичность анализировали с помощью окрашивания аннексином-V и 7-AAD, как упоминалось ранее. Даже при самой высокой концентрации 1 мМ липосомы не оказывали токсические эффекты на лангерин⁺ клетки (см. Фигуру 18 (В)). Как было показано ранее, интернализацию липосом детектировали с помощью липидов, изготовленных совместно с А647. Поглощение насыщалось при концентрациях выше 250 мкМ, как показано ранее (см. Фигуру 18 (С) и Фигуру 14 (С)).

[000418] В совокупности, нацеленные липосомы не демонстрировали какую-либо токсичность в течение продолжительного периода времени, а также не индуцировали гибель клеток при применении в очень высоких концентрациях в течение 24 ч.

Пример 15

Нацеленная доставка к модельным линиям клеток: SNP

Мутагенез

[000419] Мутации N288D и K313I вводили в ДНК дикого типа (wt) лангерина человека с помощью сайт-направленного мутагенеза *in vitro*. Для сайт-направленного мутагенеза использовали коммерчески доступный набор для мутагенеза (набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II XL, Agilent). Все этапы выполняли в соответствии с инструкциями производителя. В общих чертах, праймеры для сайт-направленной мутационной ПЦР конструировали с помощью онлайн-инструмента QuickChange Primer Design (Agilent). Готовили исходную смесь, и 48 мкл переносили в реакционную пробирку для ПЦР для каждой мутационной реакции. На мутационную реакцию добавляли по 1 мкл 10 мкМ прямого праймера и 1 мкл 10 мкМ обратного праймера (см. также Пример 1). Реакционную смесь переносили в амплификатор и применяли программу ПЦР в соответствии с инструкциями производителя. После реакции ПЦР 1 мкл Dpn I добавляли на 1 час при 37°C для расщепления исходных метилированных и полуметилированных цепей ДНК. Затем расщепленные реакции ПЦР трансформировали, культивировали и собирали в 5-альфа-компетентных клетках *E. coli*

(NEB). Клетки высевали на чашки с агаром, содержащим L-ампициллин, и на следующий день отбирали от двух до трех бактериальных колоний на клон и культивировали для выделения плазмиды (набор для мелкомасштабного выделения плазмид GeneJET, Thermo Fisher Scientific). Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoDrop (Implen Nanophotometer), а плазмидную ДНК секвенировали. Чтобы ввести вторую мутацию, мутагенез повторяли с мутированной плазмидой.

Оценка связывания липосом с соответствующими нуклеотидными полиморфизмами лангерина человека

[000420] Определяли эффект полиморфных остатков на активность связывания и интернализации липосом в клетки, экспрессирующие лангерин человека. Соответствующие однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) вводили в кДНК лангерина дикого типа. Лангерин дикого типа, который упоминается в этом тексте, содержит полиморфизм V278A и присутствует в человеческой популяции в 49,9% (rs741326, база данных SNP Национального центра биотехнологической информации (NCBI)). Поскольку лангерин содержит несколько вариантов SNP, основное внимание уделяли наиболее важному полиморфизму для этого исследования – двойному полиморфизму N288D/K313I, который показал повышенную аффинность связывания в отношении гликанов с концевыми остатками GlcNAc и пониженную аффинность в отношении гликанов 6SO₄-Gal, как представлено в предыдущих исследованиях (J Biol Chem, 288, 52, 36762-36771). Мутант N288D/K313I имеет 13,5% гетерозиготность (rs13383830 и rs57302492, соответственно, база данных SNP NCBI). В человеческой популяции двойной полиморфизм N288D и K313I всегда встречается вместе.

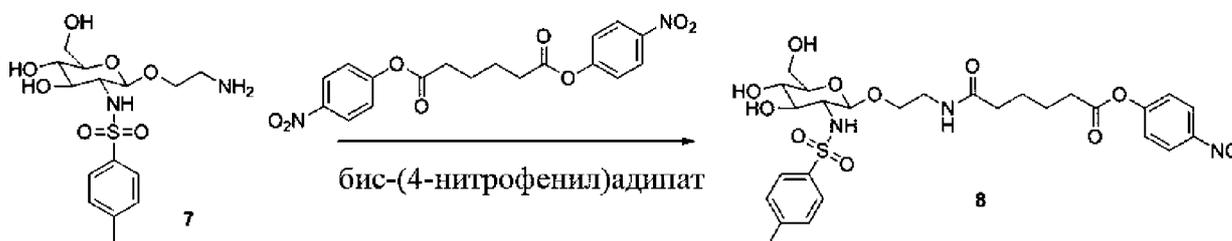
[000421] Одиночный мутант N288D и двойной мутант гибридизовали с FLAG-меткой на N-конце лангерина. Липосомальное связывание нацеленных и непокрытых липосом сначала тестировали с лангерином⁺ дикого типа и сравнивали с мутантами лангерина N288D, K313I и двойным мутантом N288D/K313I (см. Фигуру 19 (A)). Связывание нацеленных липосом с мутантом K313I было в пределах диапазона, сходного с таковым для лангерина дикого типа. N288D и двойной мутант N288D/K313I показали значительно повышенное связывание липосом. Заметна корреляция между повышенными значениями связывания для тех мутантов, которые также содержат FLAG-метку. Поскольку связывание липосом напрямую связано с экспрессией лангерина на поверхности клеток, внеклеточную экспрессию рецептора детектировали с помощью антитела к лангерину человека. Детектировали окрашивание антителом, которое было аналогично наблюдаемому для связывания нацеленных липосом (см. Фигуру 19 (B)). Нормированные значения MFI мутанта K313I были сравнимы со значениями для лангерина дикого типа, в

то время как значения MFI N288D и мутанта N288D/K313I были значительно повышены. Единственное отличие от связывания липосом заключалось в том, что окрашивание антителом выявило более высокую экспрессию мутанта N288D по сравнению с двойным мутантом. Следовательно, различные уровни экспрессии рецепторов влияли на относительное изменение окрашивания липосом в сравнении с антителом (см. Фигуру 19 (С)). Мутант N288D и двойной мутант показали значительно повышенную прочность связывания с нацеленными липосомами относительно экспрессии рецептора. Но только двойной мутант имел более чем двукратное относительное изменение по сравнению с лангерином дикого типа, что указывает на улучшенную аффинность в отношении нацеливающего лиганда. Во-вторых, исследовали эффект мутантов на результат интернализации липосом. Для этого липосомы инкубировали в течение различных периодов времени в комбинации с мутантами при 37°C, чтобы индуцировать интернализацию рецептора. В отличие от связывания липосом, самые высокие значения MFI детектировали для мутанта K313I и для лангерина дикого типа после 24 ч интернализации рецептора. До 6-часовой временной точки лангерин дикого типа и мутант K313I показывали более низкие скорости интернализации, сходные с результатами по связыванию липосом. Однако эффект мутантов был незначительным по отношению к лангерину дикого типа. Как следствие, природный полиморфизм N288D/K313I лангерина не влияет на поглощение липосом.

Пример 16

Нацеленная доставка непосредственно модифицированных белков в модельные линии клеток

Получение конструкции реакционноспособного лиганда-линкера для взаимодействия с аминокетонами белков



[000422] Соединение 7 (0,87 мг, 2,3 мкмоль) растворяли в 300 мкл ДМСО и 43 мкл пиридина в присутствии 17,4 мкл триметиламина в инертной атмосфере. Добавляли 8,63 мг (22 мкмоль) бис-(4-нитрофенил)адипата (растворенного в 193 мкл ДМСО), и раствор оставляли перемешиваться в течение 3 часов. Затем растворитель удаляли с помощью

сублимационной сушки. Остаток промывали толуолом, и растворитель удаляли под вакуумом с получением соединения 8.

Получение модифицированного лигандом зеленого флуоресцентного белка (GFP)

[000423] Зеленый флуоресцентный белок (GFP) применяли в качестве модели для непосредственной модификации белков лигандом. Аминокислотная последовательность GFP представляла собой:

```
MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLP
V
PWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTR
AE
VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFK
I
RHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLLE
F VTAAGITLGMDELYKA (SEQ ID NO: 82)
```

[000424] Раствор 1 мг GFP в 175 мкл ФСБ (рН=8) добавляли к 1,45 мг (2,31 мкмоль) реакционноспособного соединения 8 (см. выше, Пример 16) и оставляли перемешиваться 23 часа при комнатной температуре. Смесь разбавляли ФСБ (рН=7,4) до 2,5 мл и центрифугировали. Супернатант дважды подвергали диализу в течение 12 часов против ФСБ (рН=7,4) при 4°C, а затем раствор концентрировали до 1,06 мг/мл модифицированного белка.

Характеристика модифицированного лигандом зеленого флуоресцентного белка (GFP)

[000425] Для оценки общего количества лигандов на модифицированном GFP, полученном в соответствии с процедурой, описанной в Примере 17, измерения осуществляли с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (Bruker MALDI-TOF Autoflex speed) с применением 2,5-дигидроксиацетофеноновой матрицы. Сравнение средней молекулярной массы исходного GFP и модифицированного лигандом GFP показало в среднем приблизительно 7 лигандных групп на молекулу белка.

Нацеленная доставка к модельным линиям клеток: поглощение белкового груза

[000426] Затем функционализированный GFP тестировали в клеточном анализе связывания и интернализации. Оба GlcN-тозил-функционализированный GFP и неконъюгированный GFP инкубировали с клетками дикого типа или положительными по лангерину человека клетками Raji при 4°C и при 37°C в течение 1 ч или 2 ч, соответственно (см. Фигуру 21). Нацеленный GFP специфично связывался с клетками,

экспрессирующими лангерин, и насыщался при концентрациях выше 1 мкг/мл (см. Фигуру 21 (A)). Неконъюгированный GFP и нацеленный GFP, инкубированные с клетками Raji дикого типа, не показали повышенных сигналов флуоресценции. Кроме того, нацеленный GFP, инкубированный при 37°C, также показал повышение флуоресценции для лангерин⁺ клеток. Флуоресценция GFP была незначительно повышена по сравнению с анализом связывания, а также насыщалась при концентрации выше 1 мкг/мл.

[000427] Однако, в отличие от интернализации липосом, поглощение GFP было почти незаметным, что указывало на ухудшение скорости интернализации или быстрое разрушение (см. Фигуру 21 (B)).

[000428] Функционализированный GFP и неконъюгированный GFP изучали после инкубации с лангерин⁺ клетками COS-7 с помощью флуоресцентной микроскопии (см. Фигуру 16). Клетки, инкубированные с функционализированным GFP, показали повышенные сигналы флуоресценции, в то время как неконъюгированный GFP не связывался с лангерин⁺ клетками. Спустя всего 5 минут инкубации при 37°C функционализированный GFP перераспределился и через 60 минут оказался локализован в эндосомальных компартментах. Четкое окрашивание клеточной мембраны в момент времени 0 мин полностью исчезло в момент времени 60 мин, что свидетельствует об интернализации GFP. Более того, исследования связывания и конкуренции с маннаном продемонстрировали, что функционализированный GFP проявлял повышенную аффинность связывания (см. Фигуру 22 (A)). Концентрации маннана до 500 мкг/мл должны были применяться для того чтобы конкурировать за связывание с GlcN-тозил-функционализированным GFP, в то время как 50 мкг/мл маннана, напротив, было достаточно, чтобы конкурировать с функционализированными липосомами. Чтобы различить связывание и интернализацию, маннан добавляли после 4-часового этапа инкубации при 4°C (см. Фигуру 22 (A)). Конкуренцию не наблюдали ни для липосом, ни для GFP, что снова указывает на то, что оба носителя интернализуются. Однако при добавлении маннана в течение более длительного времени инкубации при 37°C, флуоресценция GFP сильно снижалась по сравнению с липосомами (см. Фигуру 22 (B)). Снижение сигнала также было заметно при инкубации с DPBS, но добавление маннана усиливало эффект.

[000429] Подытоживая, функционализированный GFP, конъюгированный приблизительно с семью лигандами, продемонстрировал повышенную аффинность связывания по сравнению с липосомами, конъюгированными с лигандом. Однако

интернализация GFP существенно ухудшалась по сравнению с липосомами, покрытыми GlcN-тозиллом.

Пример 17

Нацеленная доставка альтернативных наночастиц

Получение модифицированных лигандом гранул ПММА

[000430] 0,01 мл гранул из карбоксилированного полиметилметакрилата (0,5% исходный раствор, диаметр 130 нм, PolyAn) растворяли в 200 мкл активационного буфера (MES 50 мМ, pH=5 + 0,001% твин). Добавляли 12 мкл 1,5 М водного раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и 12 мкл 0,3 М раствора N-гидроксисукцинимиды и интенсивно перемешивали в течение 1 часа. Затем гранулы трижды промывали буфером для связывания (HBS, pH=7, 5 мМ Ca²⁺). Добавляли 2 мкл 10 мМ водного раствора нацеливающего лиганда и оставляли перемешиваться в течение ночи при комнатной температуре. Модифицированные гранулы дважды промывали этаноламином (1 М в буфере для связывания, pH=8 + 0,02% твин) с последующей промывкой и хранением с буфером HBS (pH=7, 5 мМ Ca²⁺, 0,02% твин) при 4°C.

Взаимодействие модифицированных лигандом гранул ПММА с клетками ТНР-1

[000431] Различные дозировки (5, 10, 20 мкл) раствора модифицированных лигандом гранул ПММА ($c=2,5 \times 10^7$ гранул/мл (получены, как описано в примере 18)) добавляли к суспензиям клеток ТНР-1 объемом 50 мкл (количество клеток составляло 2×10^6 клеток/мл). После 45 мин инкубации на льду и в темноте смеси осаждали, фиксировали с применением 120 мкл водного раствора параформальдегида (4%) и, наконец, ресуспендировали в 150 мкл среды. Взаимодействие клеток с гранулами анализировали с помощью проточной цитометрии, используя сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) для гейтирования клеток ТНР1, детектируя красную флуоресценцию гранул.

Пример 18

Нацеленная доставка к первичным клеткам Лангерганса

Липосомальная доставка в суспензиях эпидермальных клеток

[000432] Первичные клетки представляют собой прекрасную модель перед переходом к исследованиям *in vivo*. Образцы кожи здоровых доноров извлекали из подкожной жировой клетчатки с помощью скальпеля. Суспензии эпидермальных клеток инкубировали в среде RPMI1640 (Lonza) с добавлением 1,5 ед./мл dispaseII (Roche) и 0,1% трипсина (Sigma-Aldrich) в течение ночи при 4°C. В то время как суспензии клеток цельной кожи получали путем инкубации в среде RPMI1640 с добавлением 10% FCS (Pan-Biotech) и 1 мг/мл коллагеназы IV (Worthington Biochemical Corporation) в течение ночи

при 37°C. Отслоившийся эпидермис или цельную кожу фильтровали через 100 мкм сетчатый фильтр для клеток (Thermo Fisher Scientific) для получения суспензий отдельных клеток. Клеточные суспензии инкубировали с 16 мкМ липосом в буфере HBSS (Mg^{2+} и Ca^{2+} ; Biochrom GmbH), содержащем 1% БСА (Serva Electrophoresis GmbH), в течение 1 ч при 37°C. Для кинетического исследования липосомы инкубировали в течение различных периодов времени при температуре 37°C или 4°C. В качестве контроля добавляли 10 мМ ЭДТА (Lonza). Перед анализом клеток с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II, BD Biosciences) клетки окрашивали красителем для оценки жизнеспособности eFluor[®] 780 (eBioscience) и антителами, конъюгированными с флуорохромом (CD1a, клон: HI149; CD14, клон: HCD14; HLA-DR, клон: L243; CD45, клон: HI30 - Biolegend; лангерин, клон: MB22-9F5 - Miltenyi Biotec; подобранные по изотипу контрольные антитела) в течение 15 мин при 4°C. Для конфокальной микроскопии суспензии эпидермальных клеток окрашивали FITC-конъюгированным антителом к CD1a (клон: HI149; Biolegend) в течение 15 мин при 4°C. После 1 ч инкубации липосом при 37°C клетки анализировали с помощью микроскопии (Zeiss AxioObserver Z1).

[000433] Для применения первичных клеток суспензии эпидермальных клеток получали из образцов кожи человека, и связывание липосом с клетками Лангерганса анализировали с помощью проточной цитометрии (см. Фигуру 24 (A)). Клетки Лангерганса идентифицировали на основании экспрессии $CD45^+$, $HLA-DR^+$ и $CD1a^+$. Кроме того, краситель для оценки жизнеспособности (eFluor 780) позволяет отличать мертвые клетки (L/D). Жизнеспособные $CD45^+$ гематопоэтические клетки содержали 94% $HLA-DR^+$, $CD1a^+$ клеток Лангерганса.

[000434] Более 97% эпидермальных клеток Лангерганса были положительными по лангерину и окрашивались совместно изготовленным красителем A647, присутствующим на липосомах. Связывание липосом с клетками Лангерганса было специфичным для липосом, которые были покрыты нацеливающим лигандом, а 10 мМ ЭДТА конкурировал с Ca^{2+} -зависимым связыванием липосом. Эти результаты подтверждают специфичное взаимодействие лиганд-рецептор в первичном сайте связывания CRD лангерина. Кроме того, окрашивание липосом было специфичным для LC, поскольку $CD45^-$ и $CD45^+$, $HLA-DR^-$ клетки не были способны связывать липосомы, нацеленные на лангерин (см. Фигуру 24 (B)). Кроме того, тот факт, что ЭДТА предотвращает связывание липосом, делает его идеальным инструментом для анализа интернализации липосом путем добавления ЭДТА после этапа инкубации для удаления внеклеточно связанных липосом (см. Фигуру 24 (C)). Добавление ЭДТА после этапа инкубации не ингибировало сигнал флуоресценции, это свидетельствует о том, что липосомы были интернализированы, в то время как добавление

непосредственно в среду полностью ингибировало связывание липосом, а также их поглощение. Помимо этого липосомы инкубировали при 4°C, чтобы предотвратить интернализацию, даже при связывании липосом с рецептором на поверхности клетки. Этот этап полностью устранял сигнал флуоресценции, что подтверждает интернализацию липосом в LC. Интернализацию липосом дополнительно подтверждали с помощью микроскопии (см. Фигуру 24 (С)). В данном случае FITC-конъюгированные антитела к CD1a окрашивали клетки Лангерганса в суспензиях эпидермальных клеток. Нацеленные липосомы детектировали только в клетках Лангерганса, меченных FITC.

Липосомальная доставка в суспензиях клеток цельной кожи

[000435] Известно, что LC представляют собой единственные специализированные антигенпрезентирующие клетки в эпидермисе. Чтобы продемонстрировать специфичность липосом в отношении LC по сравнению с другими линиями дендритных клеток, суспензии клеток цельной кожи получали из образцов кожи человека и анализировали с помощью проточной цитометрии для детектирования окрашивания липосом (см. Фигуру 25). Флуоресценцию A647 отдельных подгрупп клеток Лангерганса наносили на график в зависимости от SSC-W, в то время как окрашивание липосом LC наносили на график в зависимости от внеклеточной экспрессии лангерина. Во-первых, 18% клеток из CD45⁺, HLA-DR⁺, неавтофлуоресцентных (AF) клеток идентифицировали как жизнеспособные CD1a^{high} LC, 40% клеток имели промежуточную экспрессию CD1a (CD1ainter) и 27% клеток были CD1a⁻, из которых 8% были CD14⁺, маркер моноцитов и макрофагов. В жизнеспособной популяции CD1a^{high} LC более 96% клеток экспрессировали лангерин, а 89,9% LC встроили нацеленные липосомы. CD1ainter клетки содержали 8,3% лангерин⁺ клеток, и 4,9% клеток были положительно окрашены липосомальным красителем. Подавляющее большинство липосомального окрашивания коррелировало с экспрессией лангерина, это свидетельствует о том, что нацеленные липосомы специфично связаны с лангерином. Отдельные подгруппы клеток Лангерганса (включая CD45⁻ клетки; CD45⁺, HLA-DR⁻ клетки; CD45⁺, HLA-DR⁺, AF⁺ клетки; CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺ клетки; и CD45⁺, HLA-DR⁺, CD1a⁻ клетки) не были способны связывать липосомы. Однако указанные CD45⁺, HLA-DR⁺, CD14⁺ моноциты и макрофаги неспецифично связывались с непокрытыми и нацеленными липосомами с менее чем 3%. Однако в целом непокрытые липосомы не связывали ни LC, ни отдельные подгруппы клеток LC. Эти результаты подтверждают наши предыдущие исследования с применением модельных линий клеток, экспрессирующих лангерин. Следовательно, нацеленные липосомы специфично интернализуются экспрессирующими лангерин клетками Ca²⁺-зависимым образом посредством связывания с первичным сайтом связывания CRD лангерина.

[000436] Подытоживая, нацеленные липосомы специфично доставлены к лангерин-положительным клеткам в суспензиях клеток эпидермиса, а также цельной кожи.

Пример 19

Биофизическая характеристика лигандов лангерина человека

Экспрессия и очистка рецептора

[000437] **Общие комментарии.** Оптимизированные по кодонам гены для экспрессии лангерина и DC-SIGN в *E. coli* приобретали у GenScript и Life Technologies, соответственно. Все ростовые среды или химические вещества, используемые для экспрессии и очистки рецепторов, приобретали у Carl Roth, если не указано иное.

[000438] Последовательность оптимизированного по кодомам гена лангерина, содержащая StreptagII и сайт TEV на С-конце, для экспрессии в *E. coli* представлена SEQ ID NO: 29. Для экспрессии указанной последовательности в *E. coli* применяли следующие последовательности праймеров:

Название	Последовательность (от 5' к 3')	Направление	SEQ ID NO:
Усеченный внклеточный домен лангерина (ECD) - остатки от 148 по 328	GGTGGTCATATGGCCTCGACGC TGAATGCCCAGATTCCGG	прямой праймер	30
Усеченный внклеточный домен лангерина (ECD) - остатки от 148 по 328	ACCACCAAGCTTTTATTTTCAA ACTGCGGATG	обратный праймер	31
Домен распознавания углеводов лангерина (CRD) - остатки от 193 по 328	GGTGGTCATATGGCCCAGGTGG TTAGCCAAGGCTGGAAATAC	прямой праймер	32
Домен распознавания углеводов лангерина (CRD) - остатки от 193 по 328	ACCACCAAGCTTTTATTTTCAA ACTGCGGATG	обратный праймер	33

[000439] Последовательность оптимизированного по кодонам гена DC-SIGN, содержащая StreptagII и сайт TEV на С-конце, для экспрессии в *E. coli* представлена SEQ ID NO: 52. Для экспрессии указанной последовательности в *E. coli* применяли следующие последовательности праймеров:

Название	Последовательность (от 5' к 3')	Направление	SEQ ID NO:
Внеклеточный домен (ECD) DC-SIGN – остатки от 60 по 404	GCCGCCTCTAGAGAGTAATACGA CTCACTATAGGGACTAGAGAAAG AGGAGAAAАCTAGATGGCCAAAG TTCCGAGCAGCATT	прямой праймер	53
Внеклеточный домен (ECD) DC-SIGN	GGCGGCCTGCAGGTACAAAAAAG CAGGCTACTAGT	обратный праймер	54
Домен распознавания углеводов (CRD) DC-SIGN – остатки от 205 по 404	CCGCCTCTAGAGGAGTAATACGA CTCACTATAGGGACTAGAGAAAG AGGAGAAAАCTAGATGGCTGAAC GTCTGTGTCATCCGTG	прямой праймер	55
Домен распознавания углеводов (CRD) DC-SIGN	GGCGGCCTGCAGGTACAAAAAAG CAGGCTACTAGT	обратный праймер	56

[000440] **Внеклеточный домен лангерина.** Экспрессию и очистку проводили, как было опубликовано ранее (Wamhoff, E.C. et al. (19)F Nmr-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol, 11, 2407-13 (2016)). В общих чертах, тримерный внеклеточный домен лангерина (ECD) экспрессировали в нерастворимой форме в *E. coli* BL21* (DE3) (Invitrogen). После ферментативного лизиса клеток тельца включения собирали и затем солюбилизировали. Образец центрифугировали, и ECD лангерина повторно складывали в течение ночи посредством быстрого разбавления. Затем образец подвергали диализу в течение ночи, центрифугировали и очищали с помощью аффинной хроматографии на маннан-агарозе (Sigma Aldrich). Для экспериментов с помощью ¹⁹F-ЯМР с фильтрованием по R₂ и ферментного лектинового анализа на основе липидов (Lipid-ELLA) буфер заменяли 25 мМ Трис с 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl₂ при pH=7,8 с применением обессоливающих колонок с исключением по размеру 7 кДа (Thermo

Scientific). Для экспериментов с помощью разностной ЯМР-спектроскопии на переносе насыщения (STD ЯМР) образцы ECD лангерина подвергали диализу пять раз в течение по меньшей мере 8 часов против H₂O. Впоследствии H₂O удаляли с помощью лиофилизации, и остаток хранили при -80°C. Перед экспериментами с помощью STD ЯМР ECD лангерина растворяли в 25 mM Tris-d₁₁ (Eurisotope) с 100% D₂O, 150 mM NaCl и 5 mM CaCl₂ при pH=7. Концентрацию ECD лангерина определяли с помощью УФ-спектроскопии ($A_{280, 0,1\%}=2,45$). Чистоту и монодисперсность образцов ECD лангерина анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и DLS.

[000441] **Домен распознавания углеводов лангерина и DC-SIGN.** Экспрессию и очистку проводили, как опубликовано ранее. В общих чертах, мономерные ¹⁵N-меченые домены распознавания углеводов (CRD) лангерина и DC-SIGN экспрессировали в нерастворимой форме в *E. coli* BL21* (DE3) (Invitrogen). После ферментативного лизиса клеток тельца включения собирали и затем солюбилизовали. Образец центрифугировали, и CRD лангерина и DC-SIGN повторно складывали в течение ночи посредством быстрого разбавления. Затем образец подвергали диализу в течение ночи, центрифугировали и очищали с помощью аффинной хроматографии на Strep-Tactin® (Iba). После дополнительного этапа диализа в течение ночи образец центрифугировали, и буфер заменяли 25 mM HEPES с 150 mM NaCl при pH=7,0 с применением обессоливающих колонок с исключением по размеру 7 кДа (Thermo Scientific) для экспериментов с помощью ¹⁹F-ЯМР с фильтрованием по R₂ и ¹⁵N гетероядерной ЯМР-спектроскопии с одноквантовым переносом когеренции (HSQC ЯМР). Концентрацию CRD лангерина и DC-SIGN определяли с помощью УФ-спектроскопии ($A_{280, 0,1\%}=3,19$ и $A_{280, 0,1\%}=2,98$). Чистоту и монодисперсность образцов CRD лангерина и DC-SIGN анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и DLS.

¹⁹F-ЯМР с фильтрованием по R₂

[000442] **Общие комментарии.** Эксперименты с помощью ¹⁹F-ЯМР с фильтрованием по R₂ проводили на спектрометре PremiumCompact 600 МГц (Agilent). Обработку спектров выполняли в MestReNova, а анализ данных выполняли в OriginPro (Mestrelab Research. Mestrenova. 11.0.2. (2016); OriginLab. Originpro. 9.1. (2015)). Эксперименты с ECD лангерина выполняли при концентрации рецептора 50 мкМ в 25 mM Трис с 10% D₂O, 150 mM NaCl и 5 mM CaCl₂ при pH=7,8 и 25°C. Эксперименты с CRD DC-SIGN выполняли при концентрации рецептора 50 мкМ в 25 mM HEPES с 10% D₂O, 150 mM NaCl и 5 mM CaCl₂ при pH=7,0 и 25°C. ТФУ применяли в качестве внутреннего эталона в концентрации 50 мкМ. Значения кажущейся скорости релаксации R_{2,obs} для репортерного лиганда определяли с применением импульсной последовательности Карра-Парселла-Мейбума-

Гилла (CPMG), как опубликовано ранее (Wamhoff, E.C. et al. (19)F Nmr-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol, 11, 2407-13 (2016); Carr, H.Y. & Purcell, E.M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. Phys Rev, 94, 630-638 (1954); Meiboom, S. & Gill, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. Rev Sci Instrum 29, 688-691 (1958)).

[000443] **Разработка анализа для DC-SIGN.** Анализ смещения репортера с помощью ^{19}F -ЯМР с фильтрованием по R_2 для DC-SIGN разрабатывали в соответствии с процедурой, опубликованной ранее для лангерина (Wamhoff, E.C. et al. (19)F Nmr-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol 11, 2407-13 (2016)). В общих чертах, значение K_D и скорость релаксации в связанном состоянии $R_{2,b}$ определяли при пяти концентрациях $[L]_T$ репортерного лиганда **24** в трех независимых экспериментах по титрованию. Образцы готовили путем последовательного разведения. Добавление 10 мМ ЭДТА применяли для подтверждения Ca^{2+} -зависимости взаимодействия между DC-SIGN и репортерным лигандом. Чтобы гарантировать правильность уравнений для определения K_D и K_i , вклад химического обмена $R_{2,ex}$ оценивали по дисперсии релаксации в экспериментах с помощью ^{19}F -ЯМР при концентрации репортерного лиганда 0,1 мМ в присутствии рецептора.

[000444] **Определение K_i .** Значения K_i определяли, как было опубликовано ранее для лангерина (Wamhoff, E.C. et al. (19)F NMR-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. ACS Chem Biol 11, 2407-13 (2016)). В общих чертах, эксперименты по титрованию проводили при концентрации репортерного лиганда **24** 0,1 мМ при пяти концентрациях конкурента $[I]_T$. Образцы готовили путем последовательного разведения. Значения pH для кислот GlcNS, GlcNAc-6-OS и GlcNS-6-OS контролировали и при необходимости доводили до 7,8.

^{15}N HSQC ЯМР

[000445] **Общие комментарии.** Эксперименты с помощью ^{15}N HSQC ЯМР проводили на спектрометре Ascend 700 МГц (Bruker) (Bodenhausen, G. & Ruben, D.J. Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chem Phys Lett* **69**, 185-189 (1980)). Спектры обрабатывали в NMRPipe (Delaglio, F. et al. Nmrpipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. *J Biomol NMR* **6**, 277-93 (1995)). Анализ данных выполняли с применением CCPN Analysis, MatLab и OriginPro (OriginLab. Originpro. 9.1. (2015); Vranken, W.F. et al. The Ccpn Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. *Proteins*, **59**, 687-96 (2005); MathWorks. Matlab. 9.0. Natick, U.S.A. (2016)). Эксперименты с CRD лангерина выполняли при концентрации рецептора 100 мкМ в 25 мМ HEPES с 10% D_2O , 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl_2

при pH=7,8 и 25°C. DSS-*d6* применяли в качестве внутреннего эталона в концентрации 100 мкМ. Спектры соотносили с внутренним эталоном спектрометра. Спектры регистрировали со 128 приращениями и 32 сканированиями на приращения для образцов объемом 150 мкл в 3 мм пробирках для образцов. Задержку релаксации d_1 установили на 1,4 с, а время сбора данных t_{acq} установили на 100 мс. Импульсную последовательность Уотергейта W5 использовали для подавления растворителя (Liu, M. et al. Improved Watergate Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J Magn Reson* 132, 125-129 (1998)). Используемое соотношение резонанса для CRD лангерина было опубликовано ранее (Hanske, J. et al. Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. *J Am Chem Soc*, 138, 12176-86 (2016)).

[000446] **Определение K_D .** Значения K_D определяли в экспериментах по титрованию при шести концентрациях лиганда $[L]_T$. Образцы готовили путем последовательного разведения. Возмущения химического сдвига (CSP) для резонансов CRD лангерина в режиме быстрого обмена или от быстрого до промежуточного обмена, наблюдаемые при титровании с применением лиганда, рассчитывали с помощью уравнения 1 (Williamson, M.P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 73, 1-16 (2013)).

[000447]

$$CSP = \sqrt{\frac{\delta(^1H) + (0.15\delta(^{15}N))^2}{2}}$$

Уравнение 1

[000448] Стандартное отклонение σ 0,02 м.д. было определено ранее для измерения химических сдвигов в экспериментах с помощью ^{15}N HSQC ЯМР с применением CRD лангерина (Hanske, J. et al. Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. *J Am Chem Soc*, 138, 12176-86 (2016)). Соответственно, только соотношенные резонансы со значениями CSP, превышающими пороговое значение 2σ при самой высокой концентрации лиганда, отбирали для определения значений K_D с помощью уравнения 2 при общей двухпараметрической аппроксимации (Williamson, M.P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 73, 1-16 (2013)). Стандартные ошибки получали непосредственно в результате процедур аппроксимации. Помимо этого при определении значений K_D не учитывали резонансы, которые демонстрировали расширение линии $\Delta\nu_{0.5}$ более 10 Гц при титровании как по 1H , так и ^{15}N измерению. CSP_{max} представляет собой значение CSP, наблюдаемое при насыщении сайта связывания.

[000449]

$$CSP = CSP_{\max p_b}$$

с

$$p_b = \frac{[P]_T + [L]_T + K_D - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

Уравнение 2

[000450] Для резонансов, предположительно находящихся в режиме медленного обмена при титровании, значения K_D получали из интегралов V_b и V_f , соответствующих связанному и свободному состояниям CRD лангерина, соответственно. Значения V применяли для расчета связанной фракции рецептора p_b с помощью уравнения 3. Интегралы V нормировали с помощью интеграла V N-концевого K347 и применяли для расчета связанной фракции рецептора p_b с помощью уравнения 3. Для этих расчетов учитывали только резонансы, для которых могло быть соотнесено связанное состояние. Выбранные точки данных, показывающие низкое соотношение сигнал/шум (SNR) или проблемы с коррекцией исходного уровня, обрабатывали как выбросы и не учитывали при определении значений p_b . Затем для определения значений K_D применяли однопараметрическую аппроксимацию уравнения 3 к средним значениям p_b .

[000451]

$$\frac{V_b}{V_b + V_f} = p_b$$

с

$$p_b = \frac{[P]_T + [L]_T + K_D - \sqrt{([P]_T + [L]_T + K_D)^2 - 4[P]_T[L]_T}}{2[P]_T}$$

Уравнение 3

[000452] Анализ способа связывания. Основываясь на соотнесении резонанса, значения CSP, наблюдаемые при максимальных концентрациях лиганда $[L]_T$, картировали на рентгеновской структуре CRD лангерина (код PDB: 4N32) с применением пакета инструментов Bioinformatics Toolbox от Matlab путем замены значений B-фактора (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. J Biol Chem, 288, 36762-71 (2013); MathWorks. Bioinformatics Toolbox. 4.7. Natick, U.S.A. (2016)). Полученные профили CSP визуализировали в MOE с применением цепи B CRD лангерина в комплексе с GlcNAc (ChemicalComputingGroup. Molecular Operating Environment. 2016.08. Montreal, Canada (2016)). Качество модели поддерживали с помощью Structure Preparation от MOE с последующим моделированием состояний протонирования и сети водородных связей комплекса с помощью Protonate 3D от MOE. Рецепторные поверхности визуализировали в представлении согласно Коннолли (Connolly, M.L. The Molecular Surface Package. J Mol Graph, 11, 139-41 (1993)).

STD ЯМР

[000453] **Общие комментарии.** Эксперименты с помощью STD ЯМР проводили на спектрометре PremiumCompact 600 МГц (Agilent) (Agilent) (Mayer, M. & Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. Angew Chem Int Ed, 38, 1784-1788 (1999)). Спектры обрабатывали в MestReNova, а анализ данных выполняли в OriginPro (Mestrelab Research. Mestrenova. 11.0.2. (2016): OriginLab. Originpro. 9.1. (2015)). Эксперименты с применением ECD лангерина проводили при концентрации рецептора 50 мкМ в 25 мМ Tris-d₁₁ (Eurisotope) со 100% D₂O, 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl₂ при pH=7,8 и 25°C. Эксперименты повторяли в отсутствие рецептора, чтобы исключить эффекты STD из-за прямого насыщения лигандов. Остаточную H₂O или TSP-*db* при 0,1 мМ применяли в качестве внутреннего стандарта. Спектры регистрировали в 5 мм пробирках для образцов при объемах образцов 500 мкл. Насыщение осуществляли с помощью серии гауссовых импульсов длительностью 50 мс при различных временах насыщения t_{sat} . Частоту резонансного облучения ν_{sat} устанавливали на 0,0 м.д., а частоту нерезонансного облучения ν_{ref} устанавливали на 80,0 м.д. Время сбора данных t_{acq} устанавливали на 2,0 с, а импульсную последовательность DPFGE применяли для подавления растворителя (Hwang, T.L. & Shaka, A.J. Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. J Magn Reson, 112, 275-279 (1995)). Резонансы рецепторов подавляли с помощью фильтра T_{1,rho} при времени релаксации τ 35 мс.

[000454] **Картирование эпитопа.** Связывающий эпитоп для **16** определяли при концентрации 500 мкМ. Для каждого спектра регистрировали 512 сканирований. Задержку релаксации d_1 устанавливали на 6 с, и спектры регистрировали при 5 различных временах насыщения t_{sat} , варьирующихся от 0,25 до 6,00 с. Уравнение 4 применяли для получения STD-эффекта STD для каждого анализируемого резонанса из соответствующих резонансных и нерезонансных спектров (Mayer, M. & Meyer, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. J Am Chem Soc, 123, 6108-17 (2001)). I_0 представляет собой интеграл резонанса в нерезонансном спектре, а I_{sat} представляет собой интеграл резонанса в резонансном спектре.

[000455]

$$STD = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0}$$

Уравнение 4

[000456] Кажущуюся скорость насыщения k_{sat} и максимальный STD-эффект, STD_{max} , получали из уравнения 5 при двухпараметрической аппроксимации (Angulo, J. & Nieto, P.M. Std-Nmr: Application to Transient Interactions between Biomolecules-a Quantitative Approach. Eur Biophys J, 40, 1357-69 (2011)). Стандартные ошибки получали непосредственно в результате процедур аппроксимации. Эти параметры использовали для вычисления начального наклона кривых роста STD, STD'_0 , с помощью уравнения 6. Значения STD'_0 нормировали и картировали на соответствующей структуре лиганда. Для картирования эпитопа учитывали только резонансы, для которых была выделена по меньшей мере часть мультиплета.

[000457]

$$STD = STD_{\max(1 - e^{-k_{sat}t_{sat}})}$$

Уравнение 5

$$STD'_0 = STD_{\max} k_{sat}$$

Уравнение 6

Молекулярное моделирование

[000458] **Общие комментарии.** Процедуры молекулярного моделирования выполняли в MOE (ChemicalComputingGroup. Molecular Operating Environment. 2016.08. Монреаль, Канада (2016)). Отмечали отклонения от вариантов и параметров по умолчанию. Силовое поле AMBER10:EHT было выбрано для уточнения положений присоединения и сети водородных связей, в то время как силовое поле MMFF94x применяли для поколения конформеров (Case, D.A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Crowley, M., R.C.Walker, Zhang, W., Merz, K. M., B.Wang, Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossváry, I., K.F.Wong, Paesani, F., Vanicek, J., X.Wu, Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V. and P.A. Kollman. Amber. 10. San Francisco, U.S.A. (2008); Gerber, P.R. & Muller, K. Mab, a Generally Applicable Molecular Force Field for Structure Modelling in Medicinal Chemistry. J Comput Aided Mol Des, 9, 251-68 (1995); Halgren, T.A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of Mmff94. J Comput Chem, 17, 490-519 (1996)).

[000459] **Разработка модели фармакофоров и получение комплекса лангерина.** Выполняли структурное выравнивание сайтов связывания углеводов лангерина в комплексе с GlcNAc (коды PDB: 4N32) (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. J Biol Chem, 288, 36762-71 (2013)). На основе этого визуального представления определяли модель фармакофоров с отличительными особенностями для O3, O4 и O5 каркаса Glc. Пространственное

ограничение на O3 и O4 определяли с помощью сферы с радиусом r 0,5 Å, в то время как положение O5 ограничивали сферой с радиусом r 1,0 Å. Цепь В CRD лангерина в комплексе с GlcNAc применяли в качестве структурной основы для проведенного исследования молекулярного присоединения. Помимо этого моделировали альтернативную конформацию для K313, наблюдаемую для комплекса лангерина с Gal-6-OS, и включали в исследование (Feinberg, H. et al. Structural Basis for Langerin Recognition of Diverse Pathogen and Mammalian Glycans through a Single Binding Site. *J Mol Biol*, 405, 1027-39 (2011)). Общее качество модели и геометрию белка оценивали и поддерживали с помощью Structure Preparation от MOE. Затем состояния протонирования и сеть водородных связей комплекса моделировали с помощью Protonate 3D от MOE с последующим удалением всех молекул растворителя.

[000460] **Молекулярное присоединение.** Конформации для **16** получали с применением Conformation Import от MOE. Способ размещения на основе фармакофоров применяли для получения положений присоединения, которые мы оценивали с помощью функции London ΔG. Положения с высокими оценками уточняли с применением моделирования молекулярной механики, повторно оценивали с помощью функции GBIV/WSA ΔG, фильтровали с применением модели фармакофоров и записывали в выходную базу данных (Corbeil, C.R., Williams, C.I. & Labute, P. Variability in Docking Success Rates Due to Dataset Preparation. *J Comput Aided Mol Des*, 26, 775-86 (2012)). Конформационную гибкость сайта связывания углеводов учитывали путем введения происходящих из В-фактора связей с атомами боковой цепи. Уточненные положения присоединения ранжировали в соответствии с их оценкой GBIV/WSA ΔG и оценивали визуально применительно к экспериментам, проведенным с помощью ¹⁵N HSQC и STD ЯМР.

Пример 20

Моносахариды, основанные на принципе гепарина, представляют собой благоприятные каркасы для конструирования гликомиметических лигандов

[000461] Помимо своей функции рецептора распознавания патогенов лангерин взаимодействует с собственными антигенами, такими как гликозаминогликаны, включая гепарин (Munoz-Garcia, J.C. et al. Langerin-Heparin Interaction: Two Binding Sites for Small and Large Ligands as Revealed by a Combination of NMR Spectroscopy and Cross-Linking Mapping Experiments. *J Am Chem Soc*, 137, 4100-10 (2015); Hanske, J. et al. Calcium-Independent Activation of an Allosteric Network in Langerin by Heparin Oligosaccharides. *ChemBioChem*, accepted (2017); Zhao, J. et al. Kinetic and Structural Studies of Interactions between Glycosaminoglycans and Langerin. *Biochemistry* (2016)). Эти линейные

полисахариды состоят из повторяющихся дисахаридных звеньев, состоящих из галактозы или уроновых кислот и выборочно сульфатированного N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). На основании 10-кратного повышения аффинности ($K_D=0,49\pm 0,05$ мМ) по сравнению с дисахаридами маннозы (Man) (K_D =приблизительно 4 мМ), о котором недавно сообщалось для происходящего из гепарина трисахарида, проводили эксперименты методом ^{19}F -ЯМР с фильтрованием по R_2 с наблюдением за лигандом, чтобы определить значения K_i для набора выборочно сульфатированных производных GlcNAc (см. Фигуру 27А) (Holla, A. & Skerra, A. Comparative Analysis Reveals Selective Recognition of Glycans by the Dendritic Cell Receptors Dc-Sign and Langerin. *Protein Eng Des Sel*, 24, 659-69 (2011); Munoz-Garcia, J.C. et al. Langerin-Heparin Interaction: Two Binding Sites for Small and Large Ligands as Revealed by a Combination of NMR Spectroscopy and Cross-Linking Mapping Experiments. *J Am Chem Soc*, 137, 4100-10 (2015); Wamhoff, E.C. et al. (^{19}F) NMR-Guided Design of Glycomimetic Langerin Ligands. *ACS Chem Biol*, 11, 2407-13 (2016)). Интересно отметить, что величины аффинности глюкозамин-2-сульфата (GlcNS) ($K_i=1,4\pm 0,2$ мМ), N-ацетилглюкозамин-6-сульфата (GlcNAc-6-OS) ($K_i=0,6\pm 0,1$ мМ) и глюкозамин-2-сульфат-6-сульфата (GlcNS-6-OS) ($K_i=0,28\pm 0,06$ мМ) были сопоставимы или выше, чем наблюдаемые для происходящих из гепарина олигосахаридов и других моносахаридов, включая Glc ($K_i=21\pm 4$ мМ), GlcNAc ($K_i=4,1\pm 0,7$ мМ) и маннозу ($K_i=4,5\pm 0,5$ мМ) (см. Фигуру 30 и Фигуру 39) (Hanske, J. et al. Calcium-Independent Activation of an Allosteric Network in Langerin by Heparin Oligosaccharides. *ChemBioChem*, 2017).

[000462] GlcNS-6-OS, представляющий наиболее эффективный идентифицированный моносахарид, продемонстрировал аддитивную взаимосвязь структура-активность (SAR) для сульфатирования в C2 и C6. Это повышение аффинности основано на образовании солевых мостиков с K299 и K313, как было показано ранее с помощью рентгеновской кристаллографии (Porkolab, V. et al. Rational-Differential Design of Highly Specific Glycomimetic Ligands: Targeting Dc-Sign and Excluding Langerin Recognition. *ACS Chem Biol* (2018)). GlcNS-6-OS продемонстрировал измененную ориентацию каркаса Glc по сравнению с комплексом лангерин-GlcNAc (Фигура 27 (B)) (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. *J Biol Chem*, 288, 36762-71 (2013)). Повышение аффинности, наблюдаемое для GlcNAc по сравнению с Glc, с другой стороны, является результатом опосредуемой H_2O водородной связи с K299. Важно отметить, что любое из этих взаимодействий можно применять для конструирования гликомиметического лиганда за счет биоизостерического замещения сульфатных групп сульфонамидным линкером. В частности, синтез аналогов GlcNS представляет собой возможный подход к наращиванию фрагментов, чтобы изучить сайт

связывания углеводов в отношении благоприятных взаимодействий (см. Фигуру 27 (А)). Эти характеристики делают сульфатированные производные GlcNAc благоприятными каркасами для конструирования гликомиметических лигандов лангерина.

Пример 21

Небольшие ароматические сульфонамидные заместители делают гликомиметики эффективными нацеливающими лигандами для лангерина и обеспечивают специфичность в отношении DC-SIGN

[000463] Предполагая сохранение ориентации каркаса Glc, наблюдаемой для GlcNAc, было предположено, что небольшие ароматические заместители в C2 повышают аффинность за счет образования катион-π-взаимодействий с K299 и K313 или π-π и Н-π взаимодействий с F315 и P310, соответственно (см. Фигуру 27 (В)). Соответственно, получали панель аналогов GlcNS 1-5, несущих выборочно замещенные фенильные кольца, с последующим определением значений K_i (см. Фигуру 39). Повышенную аффинность по сравнению с GlcNAc наблюдали для всех аналогов с 13-кратным повышением аффинности для **2** ($K_i=0,32\pm 0,05$ мМ), наиболее эффективного члена панели (см. Фигуру 29, Фигуру 31 и Фигуру 39). Аналог несет метильную группу в пара-положении фенильного кольца, которая не вносит существенный вклад в повышение аффинности, что иллюстрируется значением K_i , полученным для **1** ($K_i=0,37\pm 0,04$ мМ).

[000464] Несмотря на свою низкую сложность, **2** демонстрирует аффинность, превосходящую аффинность гликанов, ранее применявшихся в качестве нацеливающих лигандов для подгрупп ДК, отличных от LC (Fehres, C.M. et al. Cross-Presentation through Langerin and Dc-Sign Targeting Requires Different Formulations of Glycan-Modified Antigens. J Control Release, 203, 67-76 (2015)). В данном случае было продемонстрировано, что антиген группы крови Le^X ($K_{D,DC-SIGN}$ =приблизительно 1 мМ) стимулирует DC-SIGN-зависимую интернализацию липосом выделенными кожными ДК для активации Т-клеток *in vitro* (Pederson, K., Mitchell, D.A. & Prestegard, J.H. Structural Characterization of the Dc-Sign–Lex Complex. Biochemistry, **53**, 5700-5709 (2014)). Эти сообщения побудили отдать предпочтение **2** для приложений нацеленной доставки за счет введения этиламинного линкера в β-ориентации C1 каркаса Glc с получением нацеливающего лиганда **15** (см. Фигуру 27 (А)).

[000465] После ацетилирования аминогруппы получали модельный лиганд **16** (Фигура 27 (А)). Определение значения K_i для **16** ($K_i=0,24\pm 0,03$ мМ) выявило 42-кратное повышение аффинности по сравнению с эталонной молекулой **21** на основе маннозы ($K_i=10\pm 1$ мМ) (Фигура 27 (А) и 27 (С) и Фигура 29). Чтобы подтвердить эти значения аффинности и расширить понимание процесса распознавания, выполняли эксперименты с

помощью ^{15}N HSQC ЯМР с наблюдением за ортогональными белками (Фигура 27 (D) и 28 (A), Фигура 29 и Фигура 32). Примечательно, что значительная доля резонансов, демонстрирующих возмущения химического сдвига (CSP) при добавлении **16**, также демонстрировала расширение линии $\Delta\nu_{0.5}$ более 10 Гц, что указывает на явления промежуточного обмена. Соответственно, эти резонансы не учитывали при определении K_D . Одновременно наблюдали явления медленного обмена для группы резонансов, соответствующих Y251, I253, N297 и K299 (Фигура 27 (A)). Анализ пиков быстрого обмена и медленного обмена выявил значения аффинности, сопоставимые со значениями K_i , полученными для **16** ($K_{D,\text{fast}}=0,23\pm 0,07$ мМ, $K_{D,\text{slow}}=0,3\pm 0,1$ мМ), а также **21** ($K_D=12\pm 1$ мМ) (Фигура 27 (D), Фигура 29, Фигура 32). Аналогичным образом, аффинность **2** подтверждали с помощью ^{15}N HSQC ЯМР ($K_{D,\text{fast}}=0,46\pm 0,04$ мМ, $K_{D,\text{slow}}=0,5\pm 0,2$ мМ) (Фигура 29 и Фигура 33).

[000466] Затем изучали специфичность нацеливающего лиганда **16** (см. Фигуру 27A) в отношении DC-SIGN, поскольку такая нецелевая аффинность будет означать снижение эффективности подхода и потенциальную индукцию нежелательных эффектов. Для этой цели анализ смещения репортера с помощью ^{19}F -ЯМР с фильтрованием по R_2 переносили на DC-SIGN (). **16** ($K_{i,\text{DC-SIGN}}=15\pm 3$ мМ) демонстрировал значительно уменьшенное значение K_i для DC-SIGN по сравнению с лангерином, что соответствует 63-кратному увеличению специфичности (Фигура 27 (C) и Фигура 29). В то же время **21** продемонстрировал 3,7-кратное увеличение специфичности для DC-SIGN по сравнению с лангерином ($K_{i,\text{DC-SIGN}}=2,7\pm 0,3$ мМ). Сравнение со значениями аффинности, определенными для **2** ($K_{i,\text{DC-SIGN}}=17\pm 1$ мМ) и маннозы ($K_{i,\text{DC-SIGN}}=3,0\pm 0,3$ мМ), выявило, что дифференциальное распознавание α - и β -гликозидов этими CLR вносит вклад в специфичность (Фигура 29).

Пример 22

Анализ способа связывания, основанный на данных ЯМР и молекулярного моделирования: образование π - π -взаимодействий и водородных связей ароматическими сульфонамидными заместителями опосредует повышение аффинности в отношении лангерина

[000467] Чтобы изучить способ связывания модельного лиганда **16** (см. Фигуру 27A), эксперименты с помощью ^{15}N HSQC и STD ЯМР комбинировали с исследованиями молекулярного присоединения (Фигура 28 (A)-(E)). В данном случае ориентация линкера представляла особый интерес для оценки совместимости способа связывания с презентацией нацеливающего лиганда **15** на липосомах.

[000468] Титрование **16** (см. Фигуру 27 (A)) индуцировало CSP для E285 и K299, что обеспечивает дополнительные доказательства канонического Ca²⁺-зависимого способа связывания каркаса Glc гликомиметика (Фигура 28 (B) и 28 (C)). Эти эксперименты с помощью ЯМР с наблюдением за белками дополнительно выявили сильные CSP для остатков, расположенных рядом с F315 и N307. Примечательно, что оба остатка не могут быть соотнесены, вероятно, из-за их ассоциации с гибкой длинной петлей (Hanske, J. et al. Intradomain Allosteric Network Modulates Calcium Affinity of the C-Type Lectin Receptor Langerin. *J Am Chem Soc* **138**, 12176-86 (2016)). Этот эффект сопровождается уменьшением CSP для K313 по сравнению с титрованиями маннозного аналога **21** из Фигуры 27 (A) (Фигура 32 и 34). Оба наблюдения сохраняются при титрованиях **2** из Фигуры 27 (A) и указывают на ориентацию фенильного кольца к F315 или K299, а не к K313 или P310 (Фигура 33 и 34). Интересно отметить, что дополнительные CSP были индуцированы для остатков, удаленных от связывания углеводов, что предполагает модуляцию аллостерической сети, участвующей в регуляции распознавания Ca²⁺ лангерином.

[000469] Чтобы дополнить эксперименты с помощью ЯМР с наблюдением за белками и изучить ориентацию ацетилированного этиламинного линкера, проводили картирование эпитопов методом STD ЯМР с применением **16** и **21** (см. Фигуру 27 (A)). В связывающем эпитопе **16** преобладали стабильно сильные эффекты STD для фенильного кольца, что подтверждает модель, в которой между этим заместителем и поверхностью лангерина образуются благоприятные вторичные взаимодействия (Фигура 28 (D) и Фигура 35). Ацетилированный этиламинный линкер, напротив, действительно демонстрировал стабильно слабые эффекты STD, что указывает на доступную для растворителя ориентацию и подтверждает разработанную стратегию конъюгации для аналогов GlcNS. Аналогичным образом, этиламинный линкер **21** имел ослабленные эффекты STD по сравнению с каркасом маннозы (Фигуры 36 и 37).

[000470] Наконец, молекулярное присоединение выполняли с применением рентгеновской структуры комплекса лангерина с GlcNAc (см. Фигуру 28 (E) и Фигуру 38) (Feinberg, H. et al. Common Polymorphisms in Human Langerin Change Specificity for Glycan Ligands. *J Biol Chem*, 288, 36762-71 (2013)). Полученные положения присоединения оценивали применительно к экспериментам ЯМР, и типичные положения отбирали для визуализации образования потенциальных вторичных взаимодействий. Действительно, ориентация фенильного кольца к F315 приводила к образованию π - π взаимодействий. Эта ориентация также совпала с образованием слабой водородной связи между сульфонамидным линкером и N307. Оба взаимодействия объясняют существенные значения CSP, наблюдаемые для остатков, которые ассоциированы с F315 и N307,

включая I250, Y251, N297 и K299. Кроме того, фенильное кольцо получило сильные эффекты STD, указывающие на образование вторичного взаимодействия и значительную близость к поверхности лангерина. Напротив, ацелированный этиламинный линкер продемонстрировал значительное воздействие растворителя и отсутствие консервативных вторичных взаимодействий для большинства положений присоединения. Это наблюдение соответствовало слабым эффектам STD и, таким образом, подтвердило разработанную стратегию конъюгации для аналогов GlcNS. В целом, предложен способ связывания для **16**, который демонстрирует консервативную ориентацию каркаса Glc, что согласуется с экспериментами с помощью как STD ЯМР, так и ¹⁵N HSQC ЯМР. Повышение аффинности может быть объяснено образованием π - π взаимодействий между фенильным заместителем и F315, а также водородной связью между сульфонамидным линкером и N297.

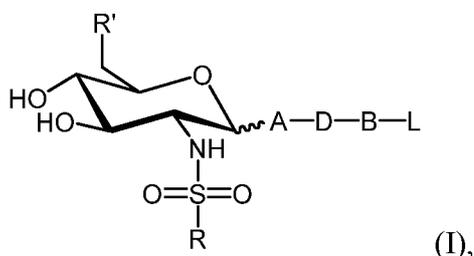
Пример 23

Применение ферментного лектинового анализа (ELLA) на основе липидов на планшете

[000471] Аналоги моносахаридов **15** или **20** (см. Фигуру 27 (A)) применяли для синтеза гликолипидов **22** и **23**, соответственно (см. Фигуру 27 (E)). Их аффинность в отношении лангерина оценивали с помощью ферментного лектинового анализа на планшете (ELLA). Несмотря на то, что дозозависимое взаимодействие могло быть продемонстрировано для **22**, взаимодействие не поддавалось детектированию для иммобилизации **23**. Это подтверждает определенное повышение аффинности модельного лиганда **16** (см. Фигуру 27 (A)) по сравнению с эталонной молекулой **21** на основе маннозы. Затем получали нацеленные липосомы, меченные Alexa Fluor (AF) 647, с диаметром $d = 160 \pm 60$ нм, которые были стабильными в течение нескольких месяцев при хранении при 4°C в ФСБ. Эксперименты с помощью ¹H-ЯМР применяли для тестирования доступности нацеливающего лиганда **15** на поверхности липосом. При этом наблюдали два состояния для резонансов, соответствующих H1' и H2' фенильного кольца. Оба состояния демонстрировали ширину линии $\nu_{0.5}$ менее 30 Гц, что указывает на остаточную гибкость из-за презентации нацеливающего лиганда на протяженном полиэтиленгликолевом линкере. Альтернативное состояние потенциально соответствует нацеливающим лигандам, ориентированным в просвет липосом. Подытоживая, **15**, вероятно, благоприятно презентирован на поверхности липосом, чтобы обеспечить взаимодействия с лангерином, что дополнительно подтверждает разработанную стратегию конъюгации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки, причем указанное средство для переноса способно специфично связываться с лангерин⁺ клеткой, при этом указанное средство для переноса содержит (а) по меньшей мере один носитель и (б) по меньшей мере один конъюгат общей формулы (I)



в которой

(i) R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила,

при этом указанные заместители независимо выбраны из группы, состоящей из -N(R^a)(R^b), -OR^a, -SR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)(R^b), -N(R^a)C(O)R^b, -N(R^a)S(O)₂R^b, -OS(O)₂R^a, галогена, -NO₂, -CN, -NC, -N₃, -NCO, -OCN, -NCS, -SCN, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, арила и гетероарила,

где R^a и R^b независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₈ алкила, C₂₋₈ алкенила, C₂₋₈ алкинила, C₃₋₆ циклоалкила, арил-C₁₋₅ алкила, гетероарил-C₁₋₅ алкила, арила, гетероарила;

(ii) R' независимо выбран из группы, состоящей из -OR^a и -NHS(O)₂R^a,

при этом R^a определен выше;

(iii) A-D-B-L представляет собой линкерную группу, ковалентно связывающую производное глюкозы формулы (I) с носителем или с частью указанного носителя, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку.

2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что R' представляет собой -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃ или -NHS(O)₂R^a.

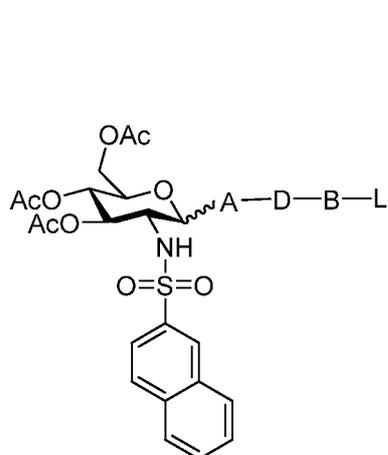
3. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что R' представляет собой -OH или -NHS(O)₂R^a.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что R' представляет собой -OH, -NHS(O)₂CH₃ или N-тозил.

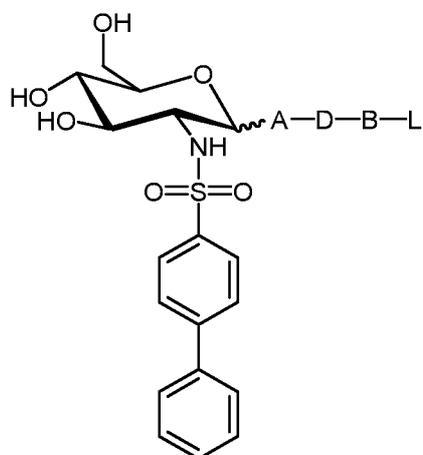
5. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что R' представляет собой -ОН.
6. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного алкила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила, C₁-C₈ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₈ алкилбиарила.
7. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила, C₃-C₆ циклоалкила, C₁-C₃ алкил C₃-C₆ циклоалкила, C₆-C₁₄ арила, C₁-C₃ алкил C₆-C₁₄ арила, гетероарила, C₁-C₃ алкилгетероарила, биарила и C₁-C₃ алкилбиарила.
8. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что R независимо выбран из группы, состоящей из замещенного или незамещенного циклогексила, фенила, бензила, бифенила, пиридила или оксазолила.
9. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что R представляет собой замещенный или незамещенный фенил.
10. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанные заместители R независимо выбраны из группы, состоящей из -N(R^a)(R^b), -OR^a, -SR^a, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)(R^b), -N(R^a)C(O)R^b, -N(R^a)S(O)₂R^b, -OS(O)₂R^a, галогена, -NO₂, -CN, -NC, -N₃, -NCO, -OCN, -NCS, -SCN, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, алкинила, арила и гетероарила, где R^a и R^b независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и C₁₋₂ алкила.
11. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанные заместители R независимо выбраны из группы, состоящей из -NH₂, -ОН, -OCH₃, -C(O)CH₃, -NHC(O)CH₃, -F, -Cl, -Br, -NO₂, -CN, C₁-C₄ алкила и фенила.
12. Применение по п. 9, отличающееся тем, что указанный фенил является моно-, ди- или тризамещенным, и заместители указанного фенила независимо выбраны из группы, состоящей из -NH₂, -ОН, -OCH₃, -C(O)CH₃, C(O)NH₂, -C(O)NHCH₃, -CH₂ОН -NHC(O)CH₃, -F, -Cl, -Br, -NO₂, -CN, C₁-C₄ алкила, нафтила и фенила.
13. Применение по п. 9, отличающееся тем, что указанный фенил является монозамещенным в пара-положении, и заместители указанного фенила независимо выбраны из группы, состоящей из

- NHC(O)CH₃, -CN, -CH₃, -F, -C(O)NH₂, -NH₂, -C(O)NHCH₃, -CH₂OH и фенила.

14. Применение по п. 12, отличающееся тем, что указанный конъюгат представляет собой конъюгат следующей формулы (I-1) или (I-2):

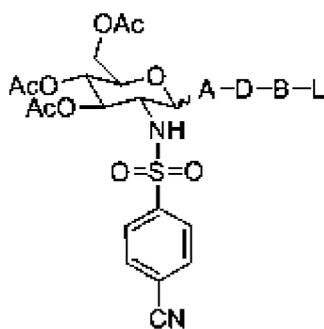


(I-1),

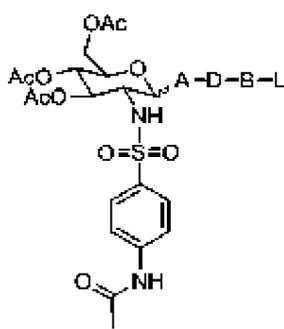


(I-2).

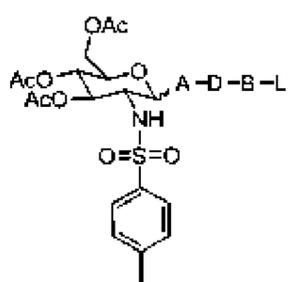
15. Применение по п. 12, отличающееся тем, что указанный конъюгат представляет собой конъюгат любой из следующих формул (I-3)-(I-15):



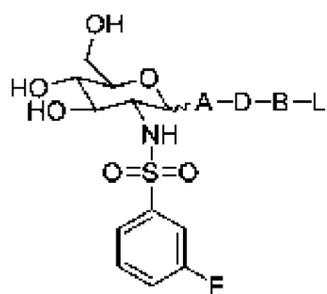
(I-3),



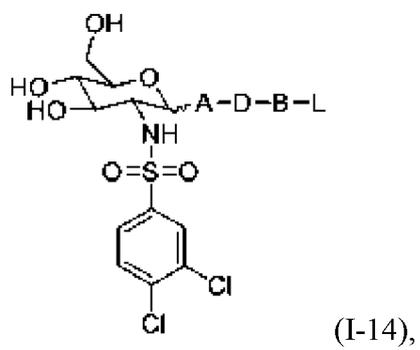
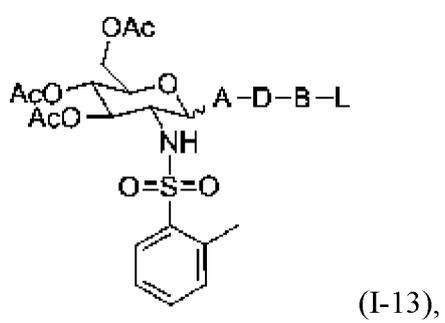
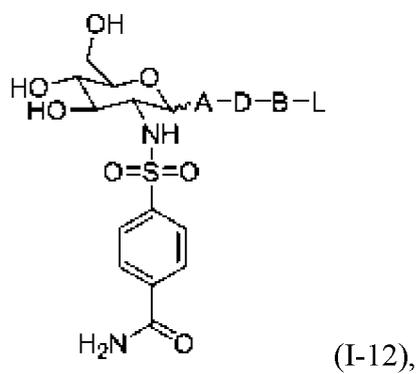
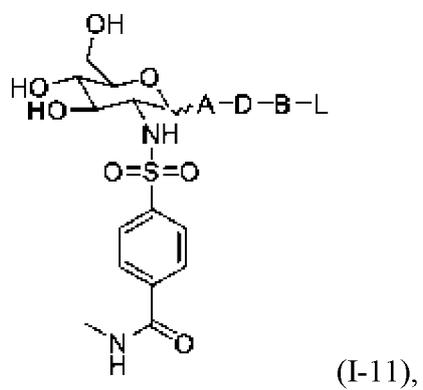
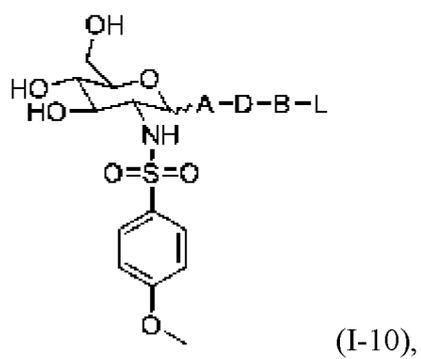
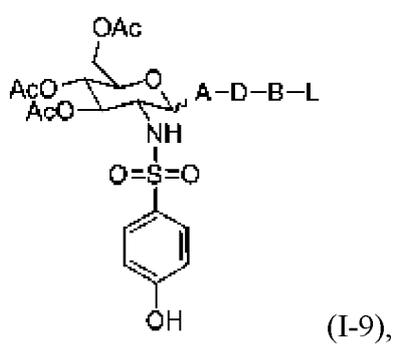
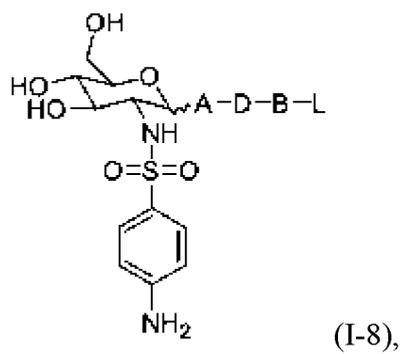
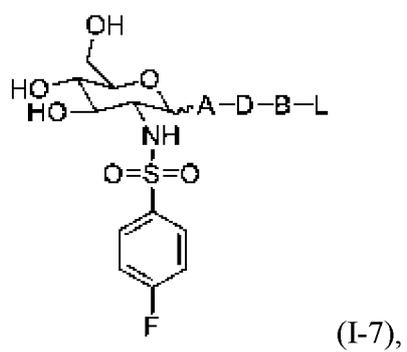
(I-4),

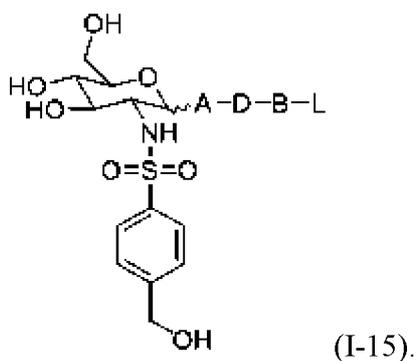


(I-5),



(I-6),





16. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанная линкерная группа A-D-B-L представляет собой группу, состоящую из спейсера A-D-B и линкера L, соединяющую производное глюкозы с носителем.

17. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный линкер L содержит по меньшей мере один синтетический полимер или природный полимер или по меньшей мере одно отдельное звено указанных полимеров или их комбинацию.

18. Применение по п. 17, отличающееся тем, что указанный синтетический полимер выбран из группы, состоящей из насыщенного и ненасыщенного углеводородного полимера; полиаминов; полиамида; сложного полиэфира; простого полиэфира, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля; блок-сополимеров, полуксамеров.

19. Применение по п. 17, отличающееся тем, что указанный природный полимер выбран из группы, состоящей из углеводов, модифицированных углеводов, пептидов, модифицированных пептидов, липидов и модифицированных липидов.

20. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что D представляет собой спейсер, соединенный с A и B, общей формулы (D-1)



в которой

D соединен с указанным линкером L посредством B, причем B выбран из группы, состоящей из

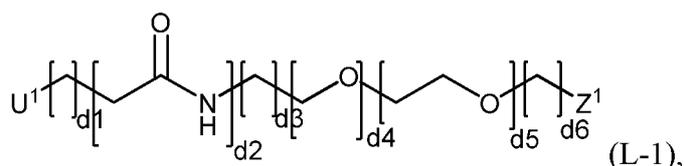
-O-, -S-, -C(R^{c1})(R^{c2})-, -S-S-, -N(R^{c1})-, -C(O)-, -C(R^{c1})=N-, -N=N-, -OC(O)-, -C(O)O-, -C(O)N(R^{c1})-, -N(R^{c1})C(O)-, -N(R^{c1})C(O)N(R^{c2})-, -N(R^{c1})C(S)N(R^{c2})-, -N(R^{c1})C(O)O-, -OC(O)N(R^{c1})-, -циклогексен- и -триазолов-;

где R^{c1} и R^{c2} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного алкила, алкенила, циклоалкила, C₁-C₈ алкилциклоалкила, арила, C₁-C₈ алкиларила, гетероарила и C₁-C₈ алкилгетероарила;

D соединен с производным глюкозы посредством A, причем A выбран из группы, состоящей из -O-, -CH₂-, -S-, -NH-, -NHC(O)-, -OC(O)-, -циклогексен- и -триазолов-;

с представляет собой целое число, выбранное из числа от 0 до 20, с1 представляет собой целое число, выбранное из числа от 0 до 20, и с2 представляет собой целое число, выбранное из числа от 0 до 20, с3 представляет собой целое число, выбранное из числа от 1 до 20, если А представляет собой -CH₂-, с3 представляет собой целое число, выбранное из числа от 0 до 20.

21. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный линкер L представляет собой линкер следующей общей формулы (L-1)



в которой

U¹ представляет собой группу, соединенную посредством В со спейсером V, причем U¹ выбран из группы, состоящей из -CH₂-, -CH=CH- или -C≡C-;

Z¹ представляет собой группу, связывающую указанный линкер с указанным носителем, выбранную из группы, состоящей из -O-, -S-, -N(R^d)-, -C(R^d)(R^e)-, -R^dC=CR^e-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)S-, -C(O)N(R^d)-, -N(R^d)C(O)-, -N(R^d)C(O)N(R^e)-, -N(R^d)C(S)N(R^e)-, -N(R^d)C(O)O-, -OC(O)N(R^d)-, -циклогексен-, -триазолов-, -NHS(O)₂-, -S(O)₂-, -OP(O)(H)O- или -OP(O)(OH)O-;

где R^d и R^e независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, замещенного или незамещенного C₁₋₃₂ алкила, C₂₋₃₂ алкенила, C₃₋₈ циклоалкила, арила, C₁₋₈ алкиларила, гетероарила, C₁₋₈ алкилгетероарила; и

каждый из d1-d5 представляет собой целое число от 0 до 50, d6 представляет собой целое число от 1 до 50.

22. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанная линкерная группа A-D-B-L представляет собой молекулярную цепь, имеющую общее число атомов углерода, атомов азота и атомов кислорода, содержащихся в основной цепи, по меньшей мере 4.

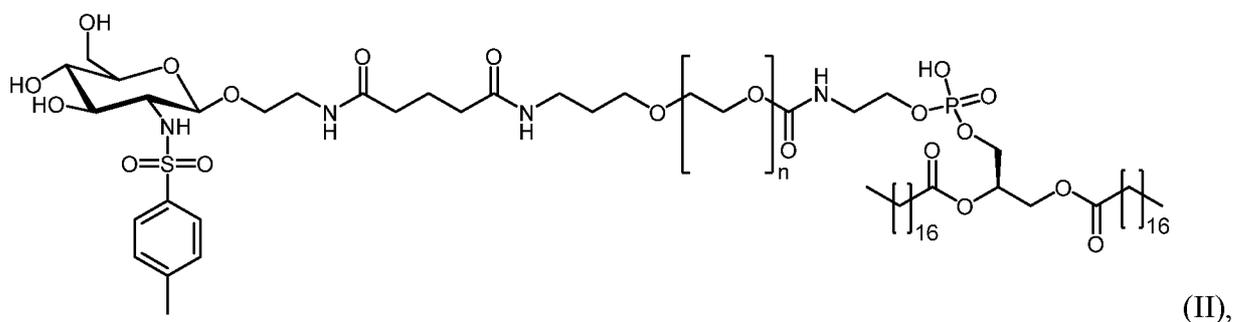
23. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанная линкерная группа A-D-B-L представляет собой молекулярную цепь, имеющую общее число атомов углерода, атомов азота и атомов кислорода, содержащихся в основной цепи, от 4 атомов до 600 атомов.

24. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанная линкерная группа A-D-B-L представляет собой молекулярную цепь, имеющую длину основной цепи от приблизительно 0,4 нм до приблизительно 400 нм.

25. Применение по любому из пп. 1-24, отличающееся тем, что указанный по меньшей мере один носитель представляет собой мягкую частицу.

26. Применение по п. 25, отличающееся тем, что мягкая частица выбрана из группы, состоящей из липосомы, ниосомы, мицеллы, секвессомыTM и трансферосомы, и причем указанный конъюгат непосредственно связан посредством Z^1 с одной частью указанной мягкой частицы, при этом указанная одна часть мягкой частицы представляет собой липид, модифицированный липид, такой как секвессома или трансферосома, фосфолипид, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE), мембранный липид, модифицированный фосфатидилхолин.

27. Применение по п. 26, отличающееся тем, что указанный конъюгат связан с одной частью носителя на основе мягкой частицы, что приводит к следующей структуре (II):



где n представляет собой целое число от 0 до 150.

28. Применение по любому из пп. 1-24, отличающееся тем, что по меньшей мере один носитель выбран из группы, состоящей из наночастицы, пептида, белка, токсина, дендримера, фуллерена и углеродной нанотрубки, причем указанный конъюгат непосредственно связан посредством Z^1 с указанным носителем, или причем указанный конъюгат связан посредством Z^1 с дополнительным спейсерным элементом указанного носителя.

29. Применение по п. 28, отличающееся тем, что указанный дополнительный спейсерный элемент представляет собой природный или синтетический полимер.

30. Применение по п. 26 или 27, отличающееся тем, что указанная липосома представляет собой двухслойную фосфолипидную липосому, предпочтительно размером от 30 до 250 нм.

31. Применение по п. 26 или 27 или 30, отличающееся тем, что указанная липосома содержит дополнительный компонент, такой как холестерин, предпочтительно в количестве от приблизительно 20 до 50 мол.%, более предпочтительно в количестве приблизительно 40 мол.%.

32. Применение по п. 28, отличающееся тем, что указанная наночастица представляет собой наночастицу золота, серебра или железа, предпочтительно размером от 5 до 1000 нм.
33. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный носитель содержит груз или ассоциирован с ним.
34. Применение по п. 33, отличающееся тем, что указанный груз расположен внутри указанного носителя и/или связан с внешней стороной указанного носителя и/или интегрирован в однослойную или двухслойную структуру указанного носителя.
35. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное специфичное молекулярное нацеливание включает взаимодействие между указанным конъюгатом и рецептором, присутствующим на лангерин⁺ клетке.
36. Применение по п. 35, отличающееся тем, что указанный рецептор, присутствующий на дендритной клетке, представляет собой лектиновый рецептор С-типа (CLR) лангерин (CD207).
37. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное специфичное связывание указанного средства для переноса с дендритной клеткой основано на связывании с лектиновым рецептором С-типа (CLR) лангерином (CD207) со специфичностью, которая по меньшей мере в 2, 4, 8 или 16 раз выше, чем контроль, в клеточном анализе, включающем введение липосом в идентичных условиях в В-клетки Raji, презентующие рекомбинантный лангерин, В-клетки Raji, презентующие рекомбинантный DC-SIGN (контроль 1), и В-клетки Raji дикого типа, не презентующие лектиновый рецептор С-типа (дикий тип, контроль 2).
38. Применение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что средний размер указанного средства для переноса, измеренный методом динамического рассеяния света (DLS), составляет от 2 до 1000 нм.
39. Применение композиции, содержащей по меньшей мере одно средство для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки как определено в любом из пп. 1-38, содержащее или ассоциированное с грузом как определено в п. 33 или 34, и добавку, для нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку.
40. Применение по п. 39, отличающееся тем, что указанная добавка представляет собой двухвалентный ион, предпочтительно Ca²⁺ или Zn²⁺, адьювант или фактор, который стимулирует связывание с лектиновым рецептором С-типа (CLR) лангерином.
41. Применение по п. 39 или 40, отличающееся тем, что указанная композиция дополнительно содержит растворитель, такой как H₂O, водный раствор сахарозы, фосфатно-солевой буфер, трициновый буфер, буфер HEPES или комбинацию

растворителя, такого как любой из вышеуказанных, с ДМСО, предпочтительно в концентрации 10%.

42. Применение по любому из пп. 39-41, отличающееся тем, что указанная композиция содержит конъюгат как определено в любом из пп. 1-38 в количестве от приблизительно 1 до 10 мол.%, предпочтительно от приблизительно 4 до 6 мол.%, более предпочтительно от 4,75 до 5 мол.%.

43. Способ нацеленной доставки груза в лангерин⁺ клетку, включающий приведение средства для переноса для специфичного молекулярного нацеливания на лангерин⁺ клетки как определено в любом из пп. 1-38 или композиции как определено в любом из пп. 39-42 в контакт с лангерин⁺ дендритной клеткой.

44. Применение по любому из пп. 33-42 или способ по п. 43, отличающиеся тем, что указанный груз выбран из группы, состоящей из малой молекулы, пептида, белка, цитотоксического вещества, нуклеиновой кислоты, пигмента, красителя, металла, радионуклида, вируса, модифицированного вируса, вирусного вектора, инокулянта, плазмиды и/или многокомпонентной системы, такой как система для редактирования генома, содержащая различные компоненты, предпочтительно система CRISPR/Cas.

45. Применение по любому из пп. 33-42 или 44 или способ по п. 43 или 44, отличающиеся тем, что указанный груз представляет собой фармацевтически активное соединение или иммунологически активное соединение.

46. Применение по п. 45, отличающееся тем, что указанное фармацевтически активное соединение представляет собой ингибитор клеточной функции, такой как ингибитор апоптоза.

47. Применение по п. 45, отличающееся тем, что указанное иммунологически активное соединение представляет собой (i) соединение, способное вызывать иммунологическую реакцию в организме, (ii) иммуномодулятор, или (iii) индуктор иммунологической толерантности.

48. Применение по любому из пп. 33-42, 44 или 45 или 47, или способ по п. 43, 44 или 45, отличающиеся тем, что указанный груз содержит, по существу состоит или состоит из (i) ракового антигена или эпитопа, или содержит раковый антиген или эпитоп, (ii) антигена или эпитопа аутоиммунного заболевания, или содержит антиген или эпитоп аутоиммунного заболевания, (iii) бактериального антигена или содержит бактериальный антиген или эпитоп, (iv) вирусного антигена или содержит вирусный антиген или эпитоп, (v) паразитарного антигена или содержит паразитарный антиген или эпитоп, или (vi) аллергена или эпитопа аллергена, или содержит аллерген или эпитоп аллергена.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая средство для переноса как определено в любом из пп. 1-38 или 44-48 или композицию как определено в любом из пп. 39-42 или 44-48, причем указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом и необязательно фармацевтически приемлемым веществом-носителем или фармацевтическим адъювантом.
50. Фармацевтическая композиция по п. 49, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция подходит для перорального, внутривенного, местного, роговичного, назального, подкожного, внутрикожного, трансдермального введения, для вакцинации или для введения через волосяные фолликулы.
51. Фармацевтическая композиция по п. 49 или 50, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция обеспечена в виде пластыря, такого как нанопластырь или гидрогелевый пластырь, жидкости, крема, мази, пасты, геля, лосьона, ленты, пленки, подъязычной формы, буккальной формы, таблетки, спрея, суппозитория, вакцины или в форме микроиглы.
52. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 49-51, которая предназначена для введения с помощью медицинского устройства, такого как игла, пистолет для вакцинации, пластырь или ингалятор.
53. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 49-52 для применения в лечении или предотвращении рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления, аллергии или для гипосенсибилизации.
54. Диагностическая композиция, содержащая средство для переноса как определено в любом из пп. 1-38 или 44-48, или композицию как определено в любом из пп. 39-42 или 44-48, при этом указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом и необязательно фармацевтически приемлемым веществом-носителем или фармацевтическим адъювантом.
55. Диагностическая композиция по п. 54 для применения в диагностике, детектировании, мониторинге или прогнозировании рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления или аллергии.
56. Способ определения подходящей дозы для нацеленной на лангерин⁺ дендритные клетки терапии заболевания, включающий: (а) приведение популяции лангерин⁺ клеток в контакт с соединением, которое может быть введено в клетки; (б) определение количества клеток, которые включили указанное соединение; (с) определение подходящей дозы указанного соединения путем сравнения количества клеток с включенным

соединением и исходной популяции, предпочтительно спустя период в 1-3 дня, необязательно путем дополнительной корреляции количества клеток со включенным соединением или их статуса с результатами, известными из литературных источников.

57. Медицинский набор, содержащий по меньшей мере один элемент, выбранный из средства для переноса как определено в любом из пп. 1-38 или 44-48, и/или композиции как определено в любом из пп. 39-42 или 44-48, при этом указанный носитель содержит или ассоциирован с фармацевтически активным грузом, и необязательно листок-вкладыш с инструкциями.

58. Вакцина, содержащая средство для переноса как определено в любом из пп. 1-38 или 44-48, или композицию как определено в любом из пп. 39-42 или 44-48, при этом указанный носитель содержит груз инокулянта или ассоциирован с ним.

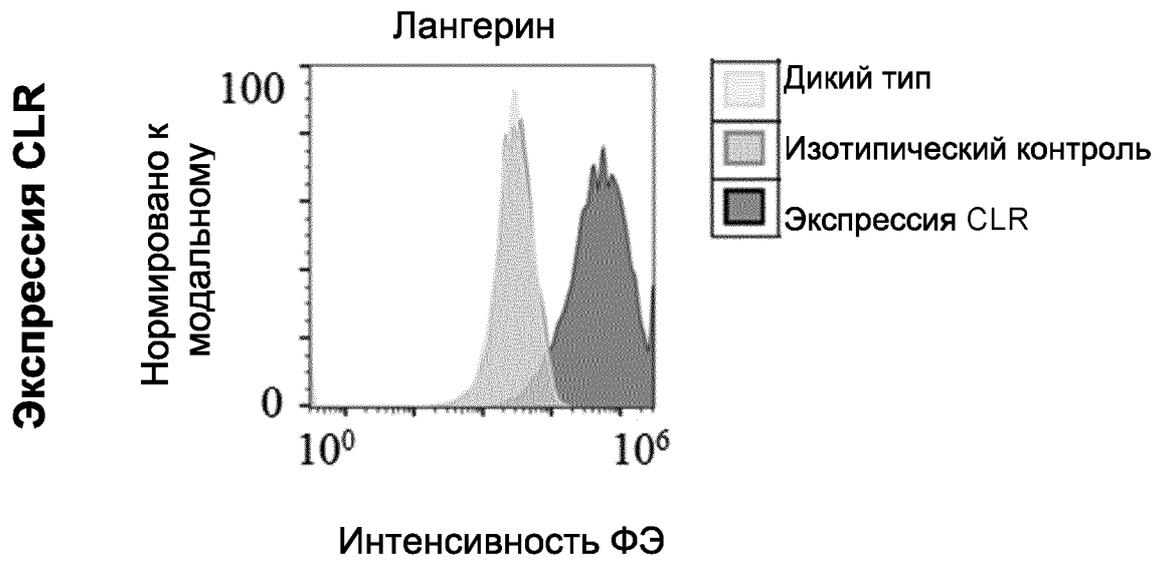
59. Вакцина по п. 58 для применения в лечении или предотвращении рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина».

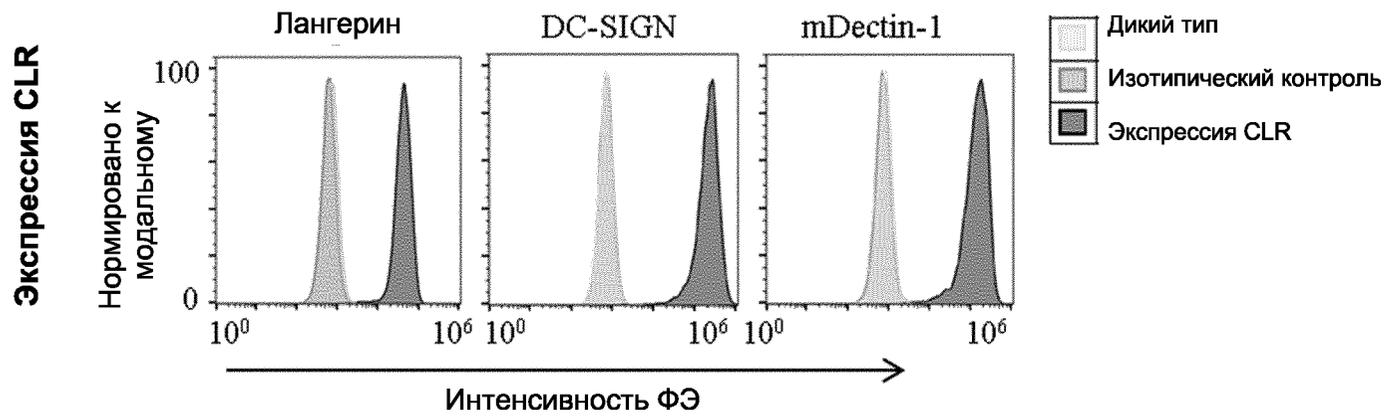
60. Способ индукции иммунного ответа против рака, бактериальной инфекции, вирусной инфекции у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса как определено в любом из пп. 1-38 или 44-48, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, композиции как определено в любом из пп. 39-42 или 44-48, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, фармацевтической композиции по любому из пп. 49-53, или вакцины по любому из пп. 58 и 59.

61. Способ лечения или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания, бактериальной инфекции, вирусной инфекции, паразитарной инфекции или заболевания «трансплантат против хозяина», локального или системного воспаления, аллергии или для гипосенсибилизации, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для переноса как определено в любом из пп. 1-38 или 44-48, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, композиции как определено в любом из пп. 39-42 или 44-48, причем указанный носитель содержит фармацевтически активный груз или ассоциирован с ним, фармацевтической композиции по любому из пп. 47-51, или вакцины по любому из пп. 58 и 59.

62. Способ по п. 60 или 61, отличающийся тем, что указанное введение представляет собой пероральное, роговичное, назальное, внутривенное, местное, подкожное, внутрикожное, трансдермальное введение, вакцинацию или введение через волосяные фолликулы.

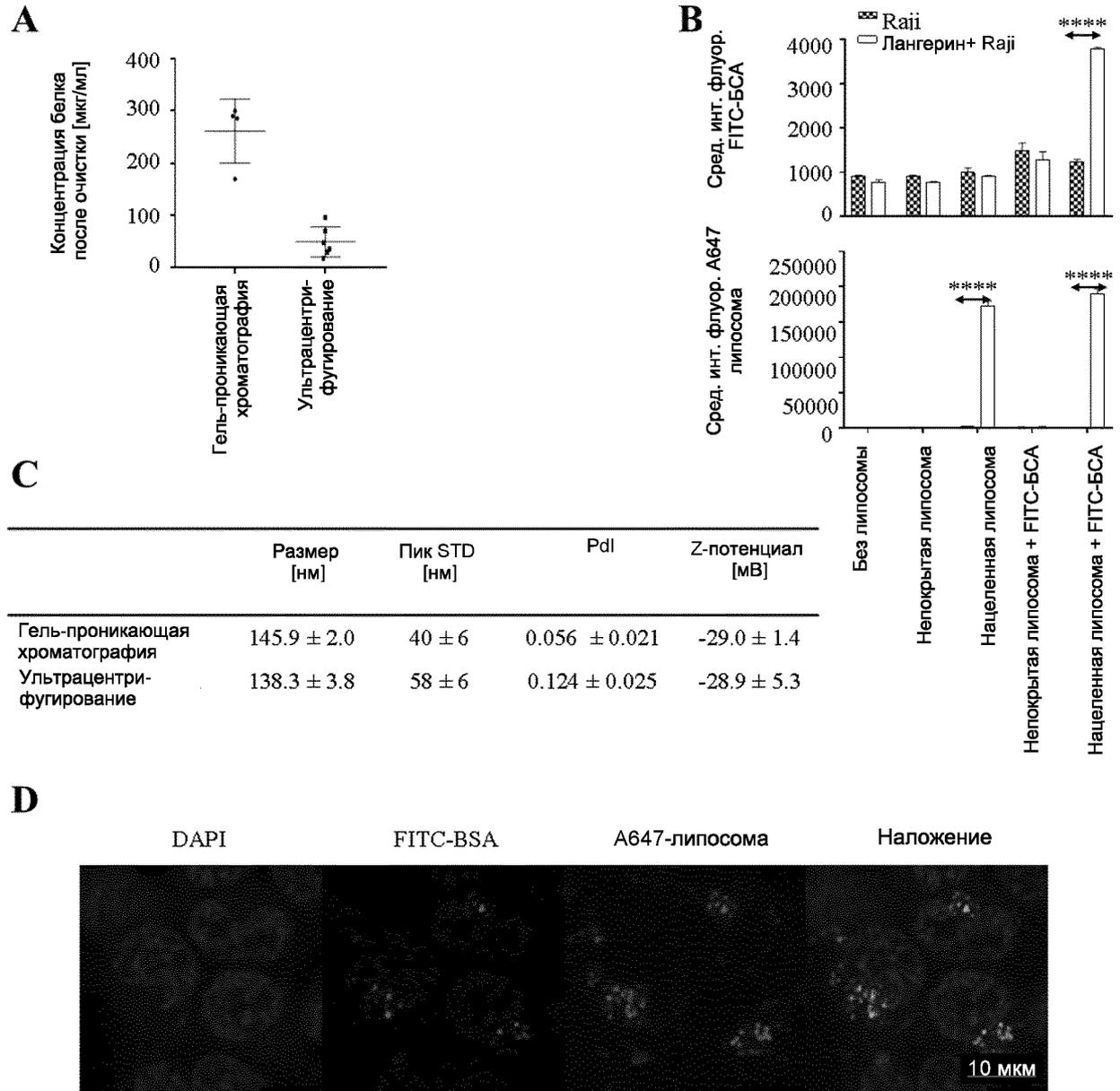
ФИГУРА 1



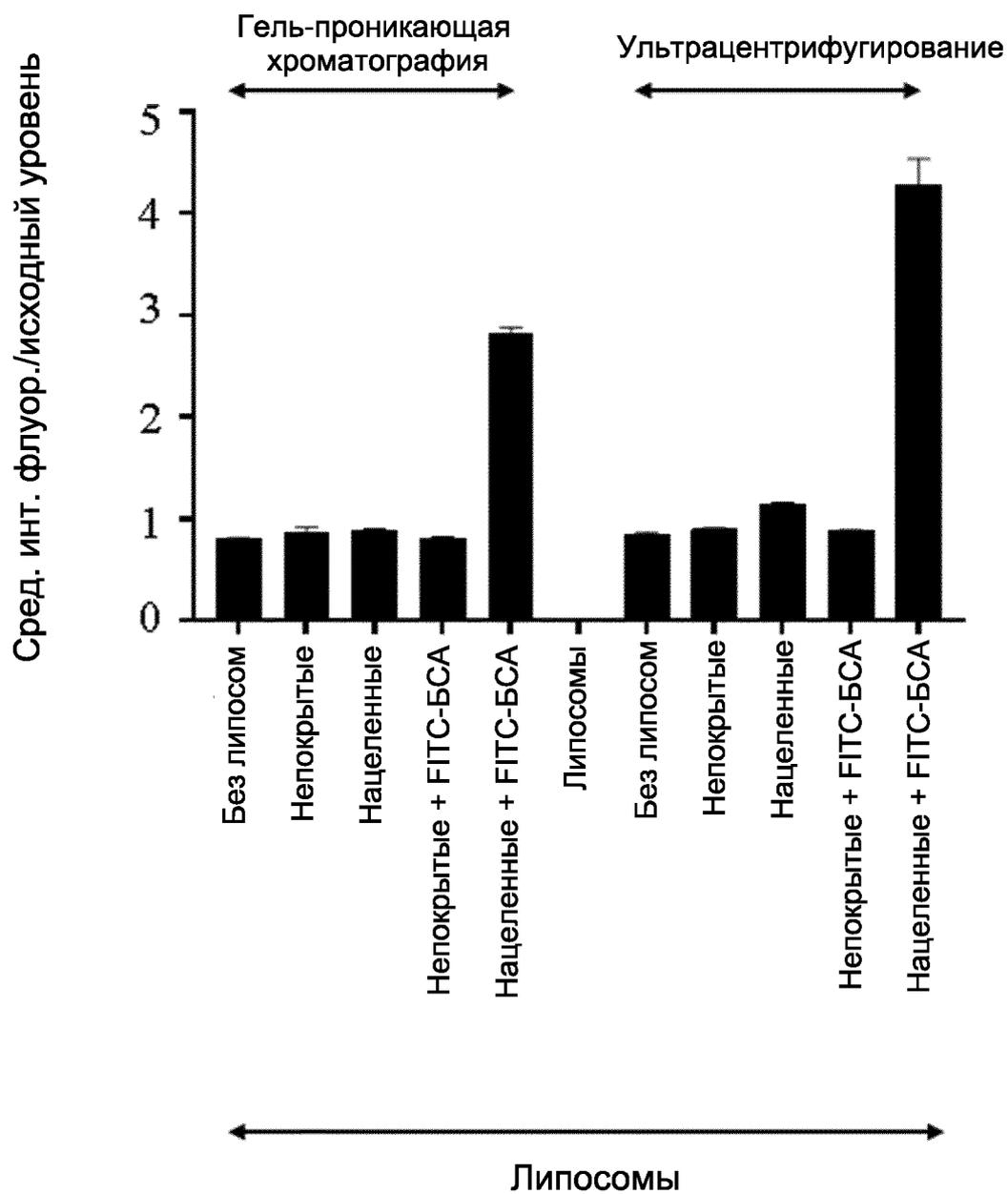


ФИГУРА 2

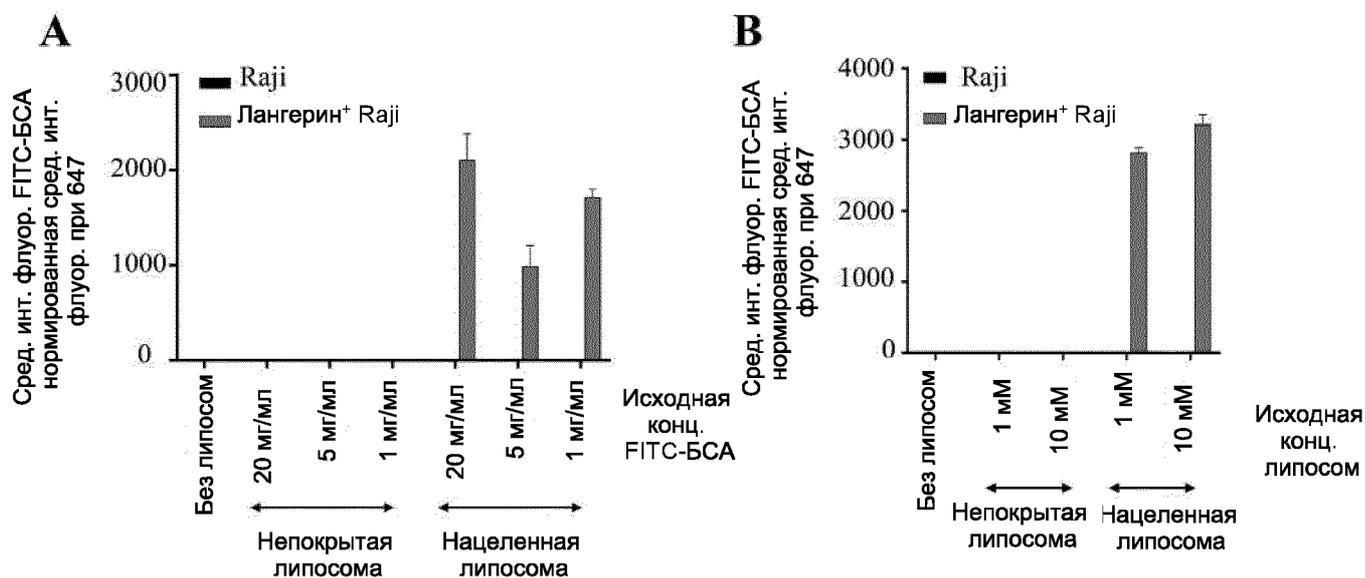
ФИГУРА 3



ФИГУРА 4

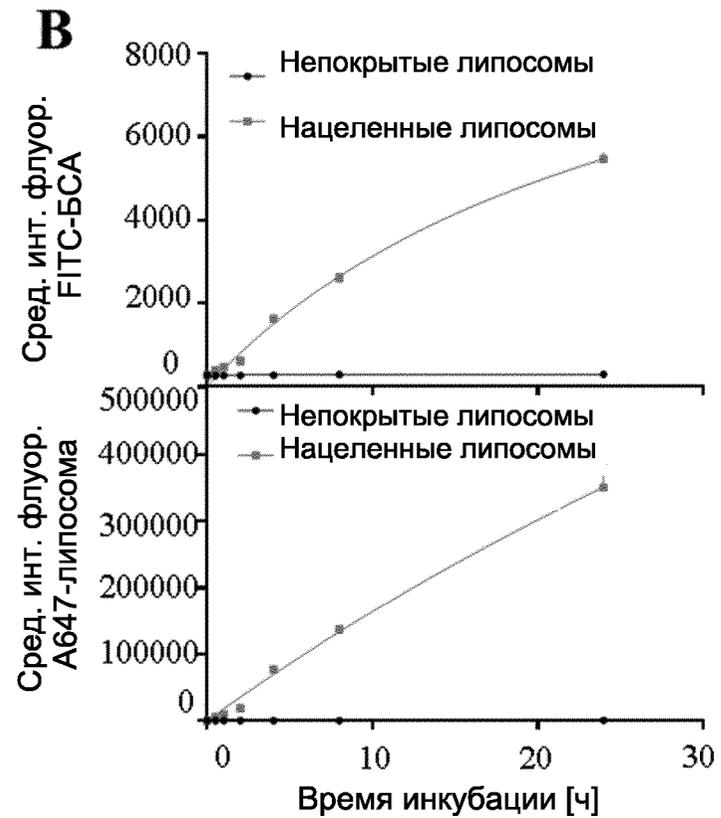
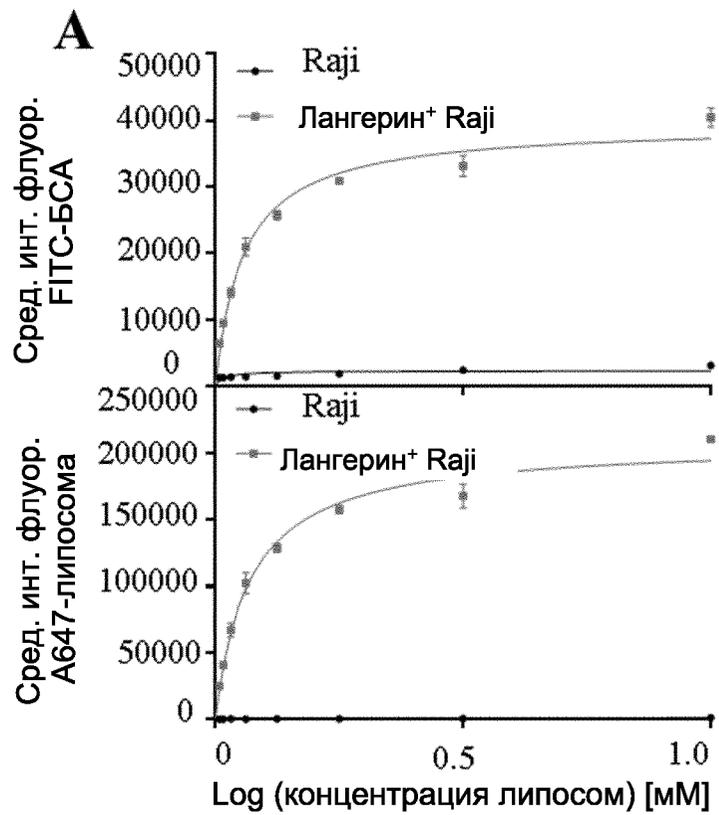


ФИГУРА 5



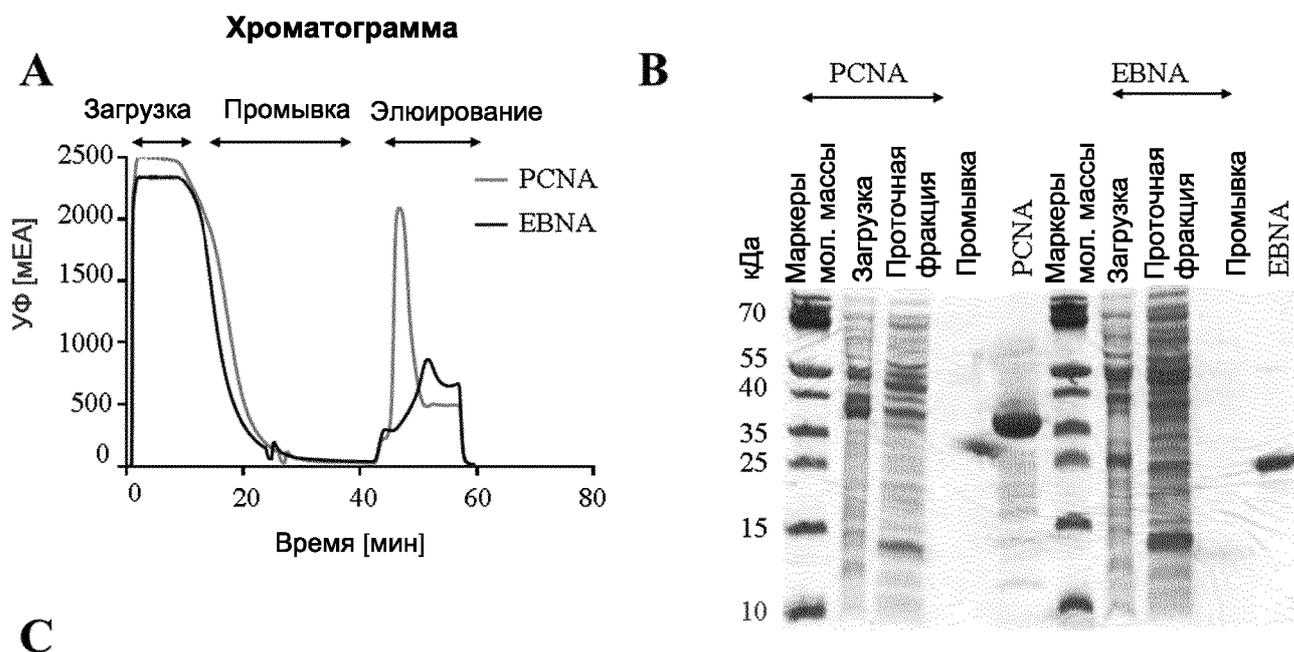
C

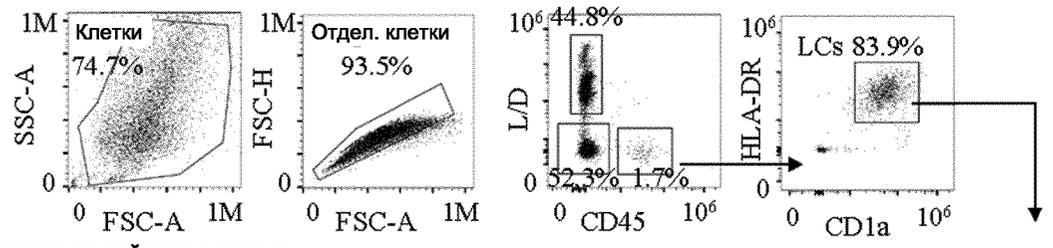
	Размер [нм]	Пик STD [нм]	PdI	Z-потенциал [мВ]	AG в 1 мМ липосом [мкг]
1,6 мМ непокрытых DPBS	145	56	0.092	-26.4	
1,6 мМ нацеленных DPBS	135	39	0.052	-30.5	
1,6 мМ непокрытых 20 мг/мл FITC-BSA	145	38	0.054	-29.6	69
1,6 мМ непокрытых 5 мг/мл FITC-BSA	150	46	0.087	-27.7	22
1,6 мМ непокрытых 1 мг/мл FITC-BSA	146	35	0.013	-27.7	81
1,6 мМ нацеленных 20 мг/мл FITC-BSA	146	42	0.058	-28.3	95
1,6 мМ нацеленных 5 мг/мл FITC-BSA	149	49	0.079	-29.1	20
1,6 мМ нацеленных 1 мг/мл FITC-BSA	146	45	0.075	-31.1	17
10 мМ непокрытых 20 мг/мл FITC-BSA	144	34	0.019	-31.8	35
1 мМ непокрытых 20 мг/мл FITC-BSA	173	48	0.246	-36.9	17
10 мМ нацеленных 20 мг/мл FITC-BSA	152	38	0.027	-31.6	29
1 мМ нацеленных 20 мг/мл FITC-BSA	149	50	0.077	-28.4	47



ФИГУРА 6

ФИГУРА 7

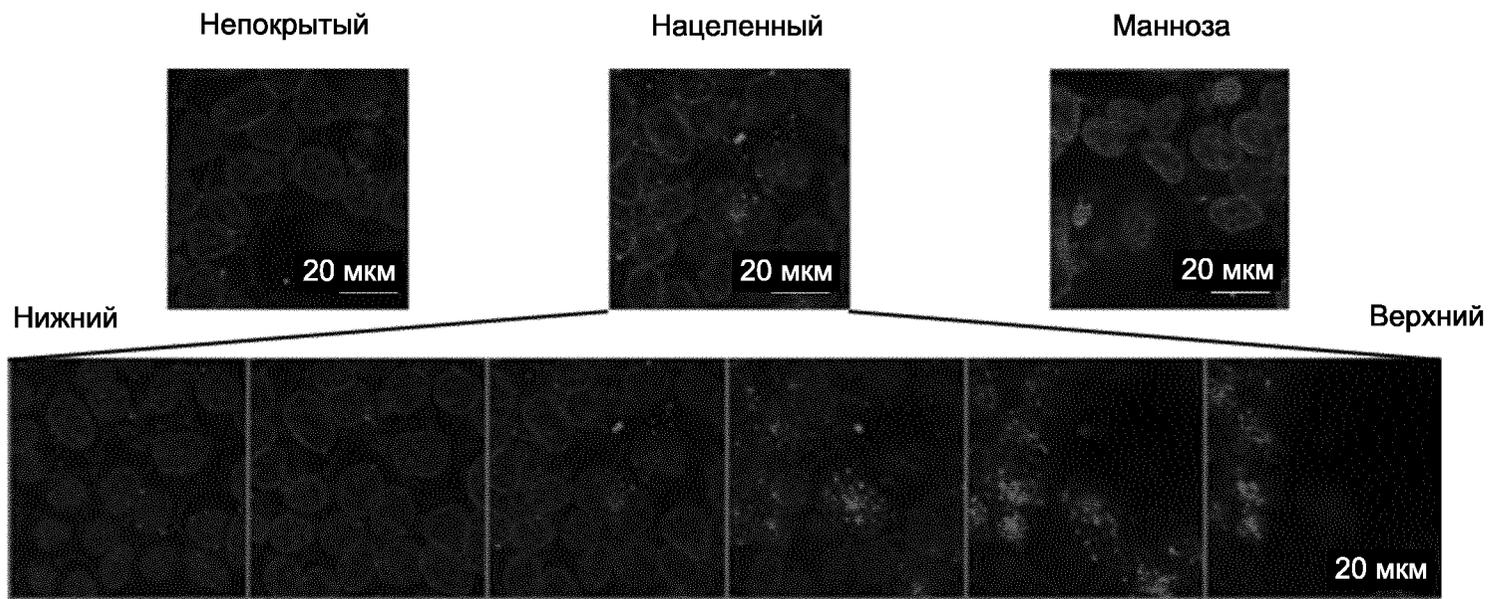




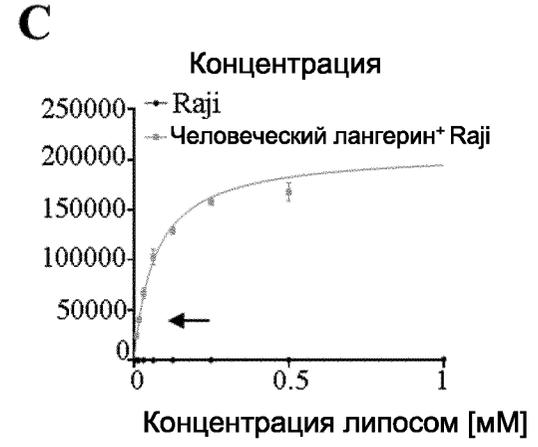
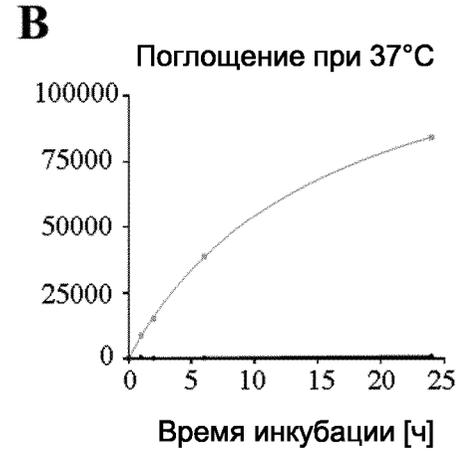
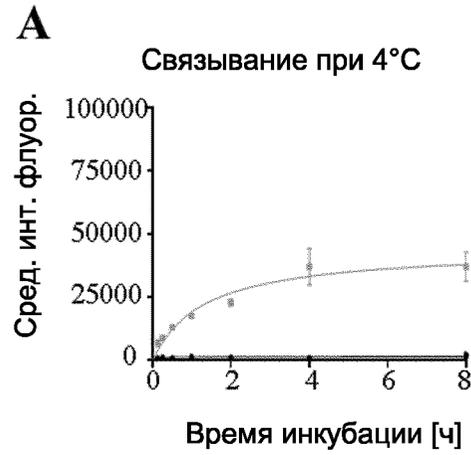
Предварительно гейтированные жизнеспособные LC:



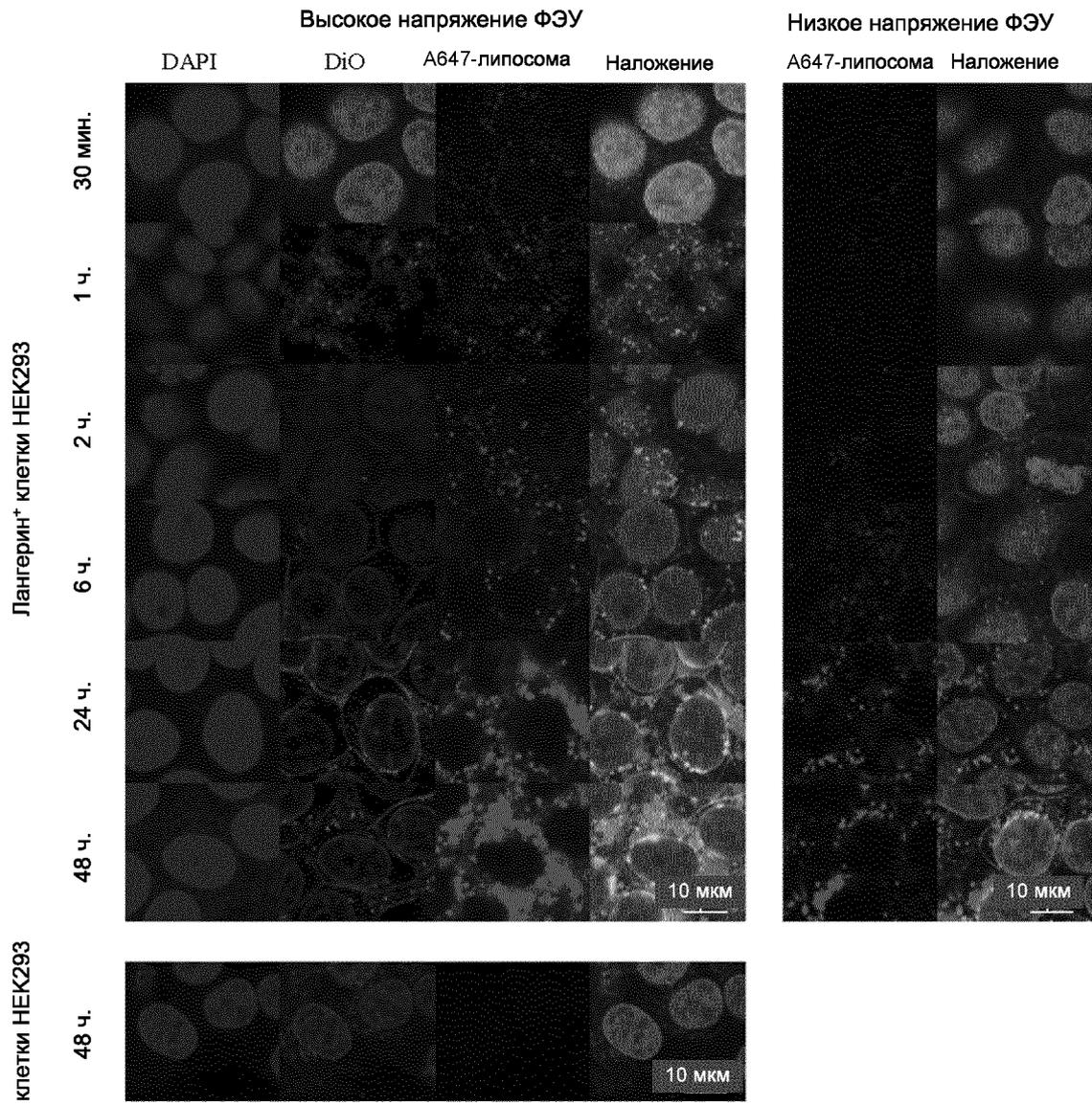
Лангерин+ клетки HEK293



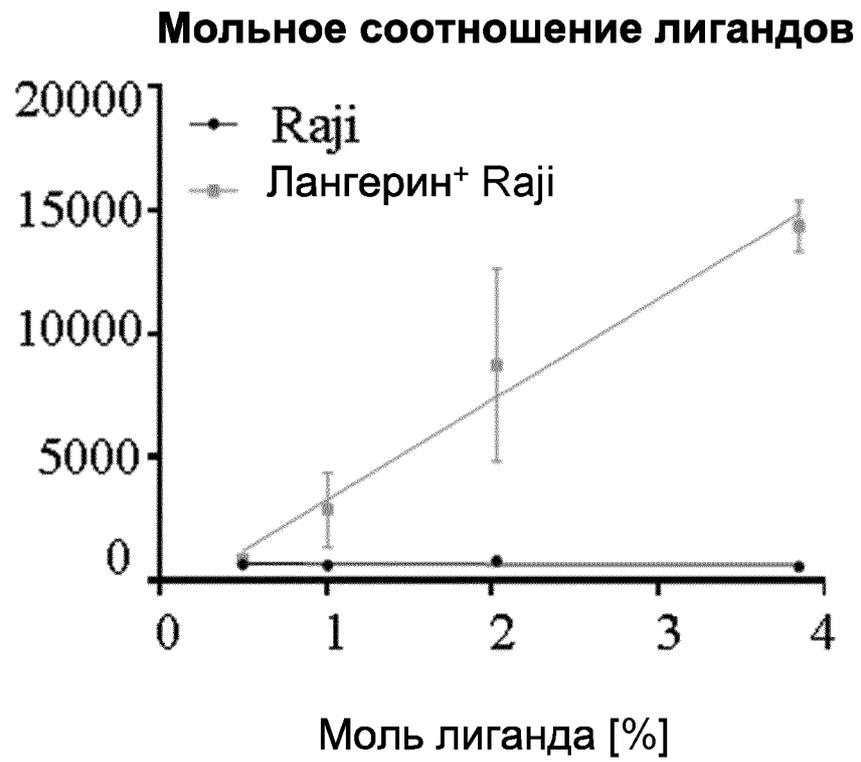
ФИГУРА 10

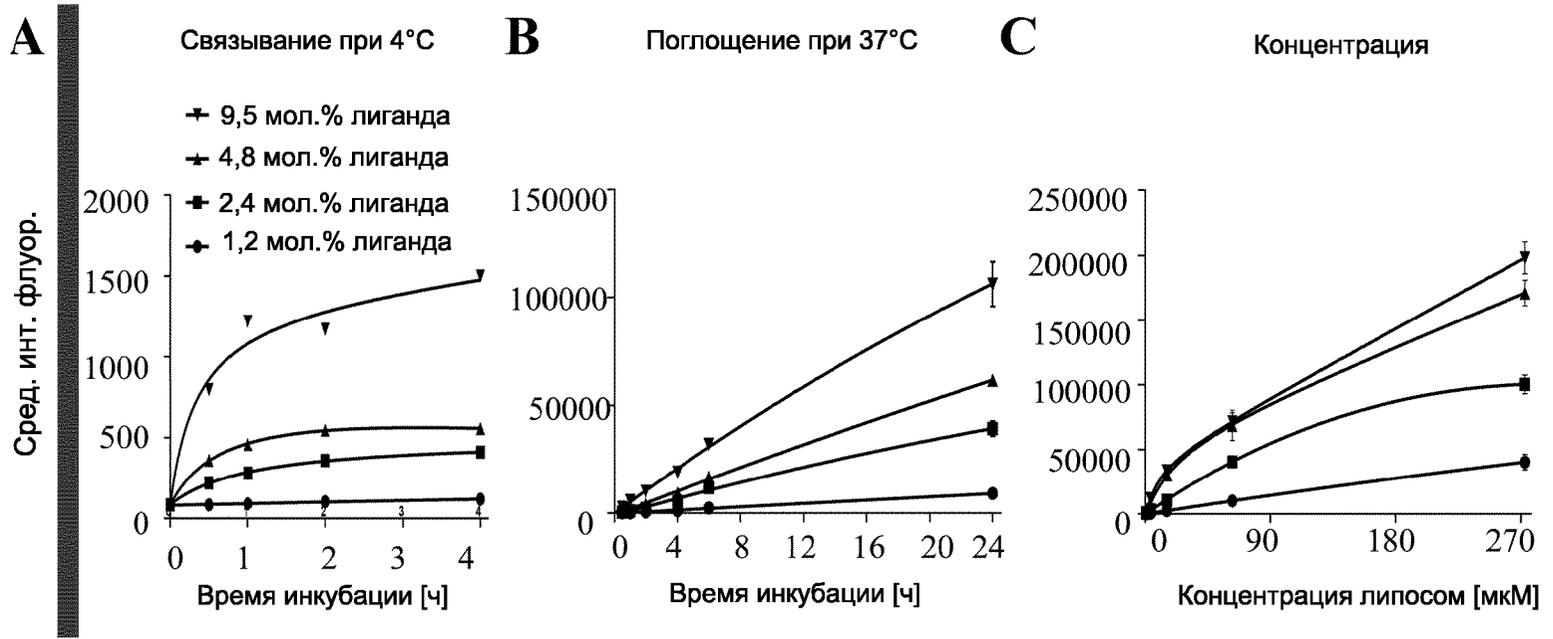


ФИГУРА 12

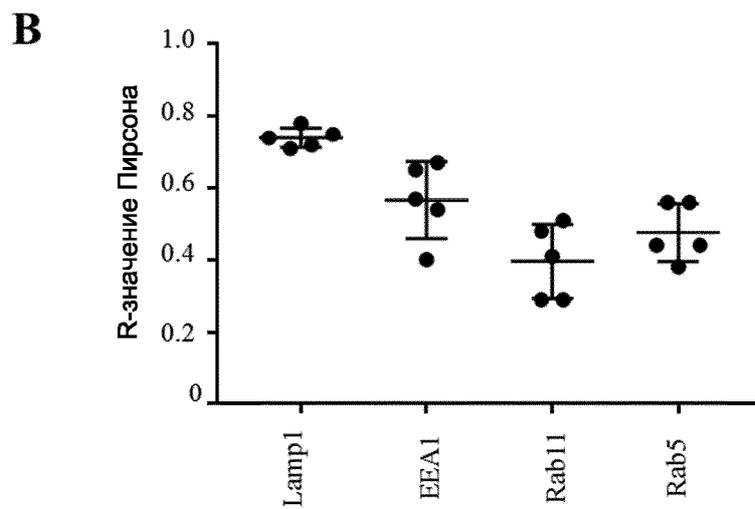
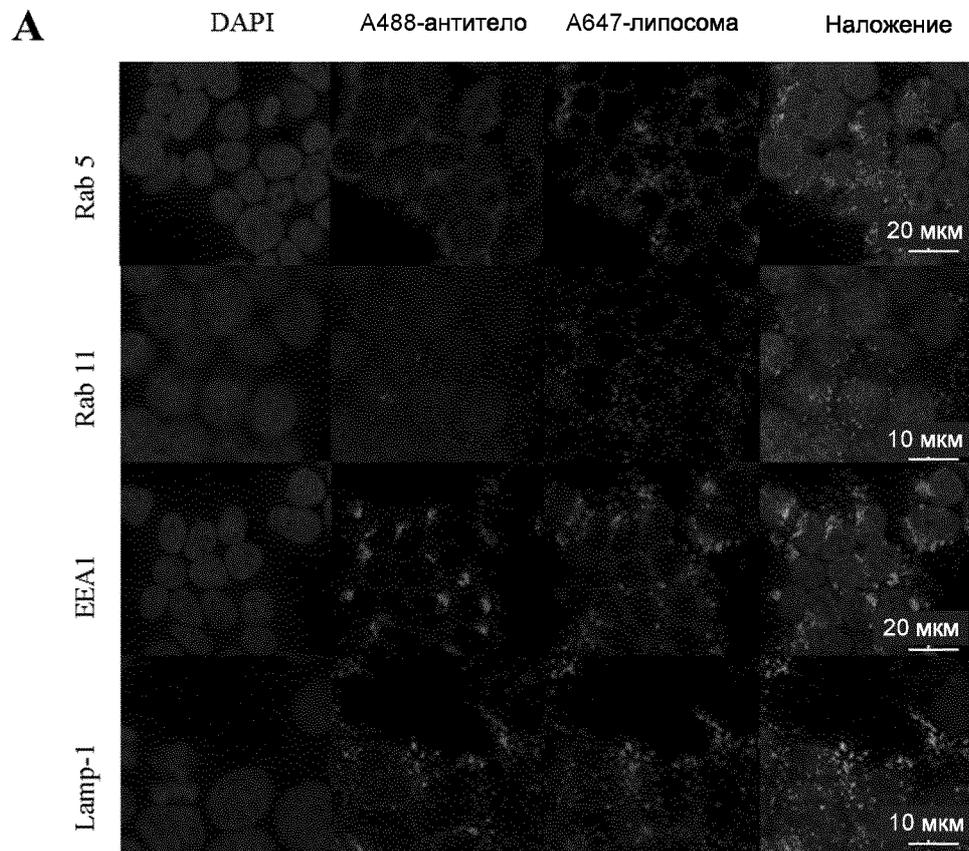


ФИГУРА 13

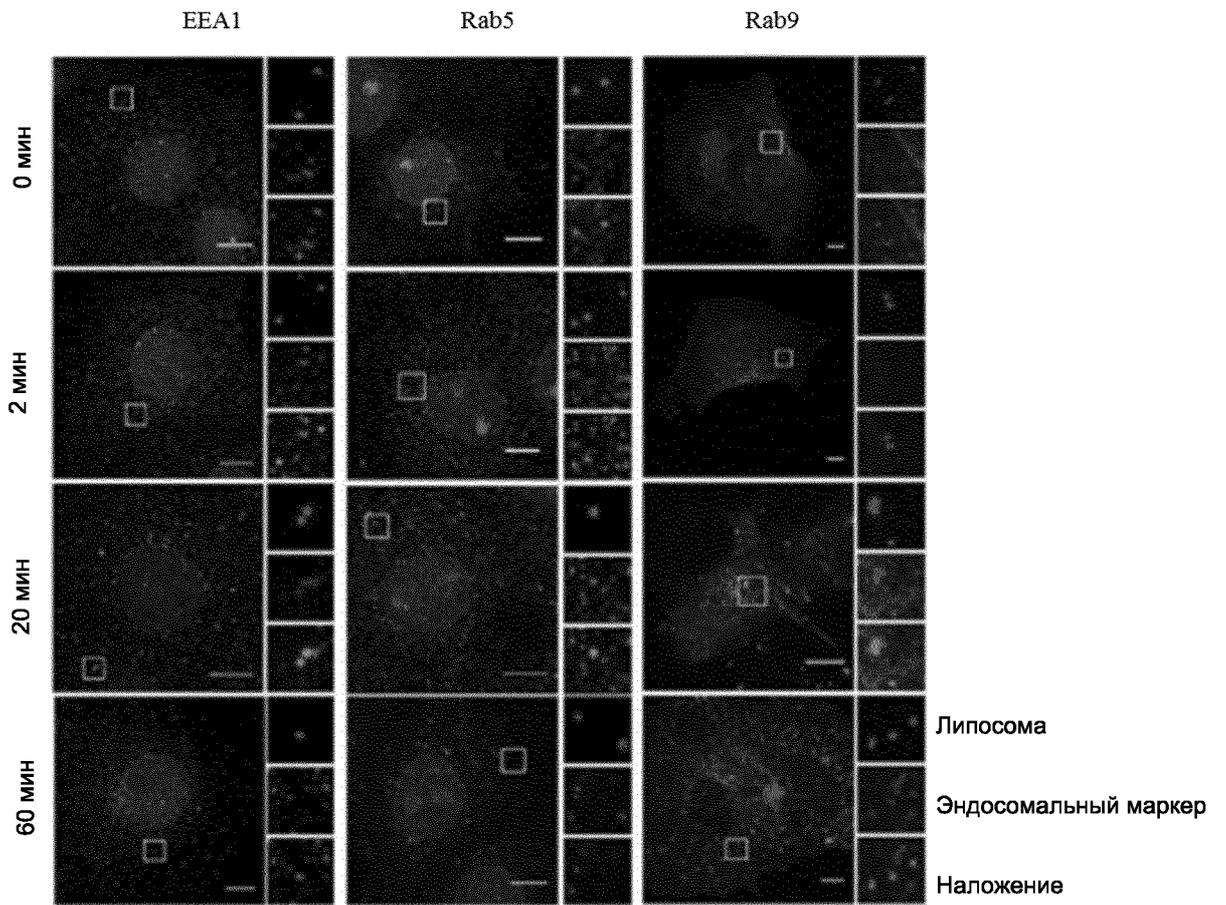


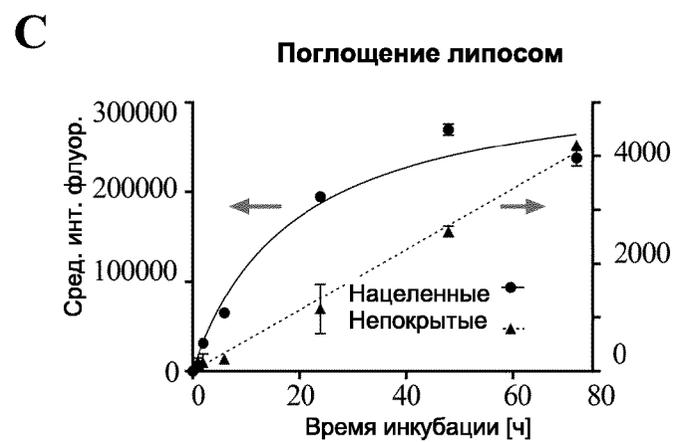
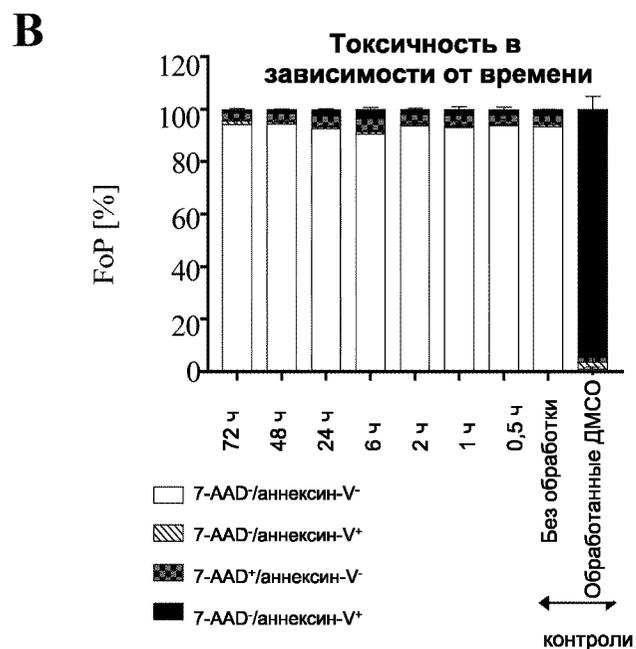
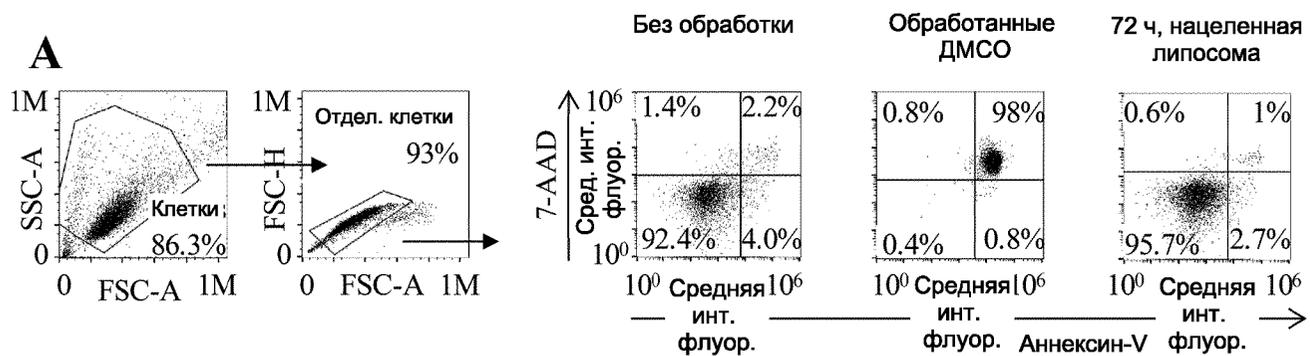


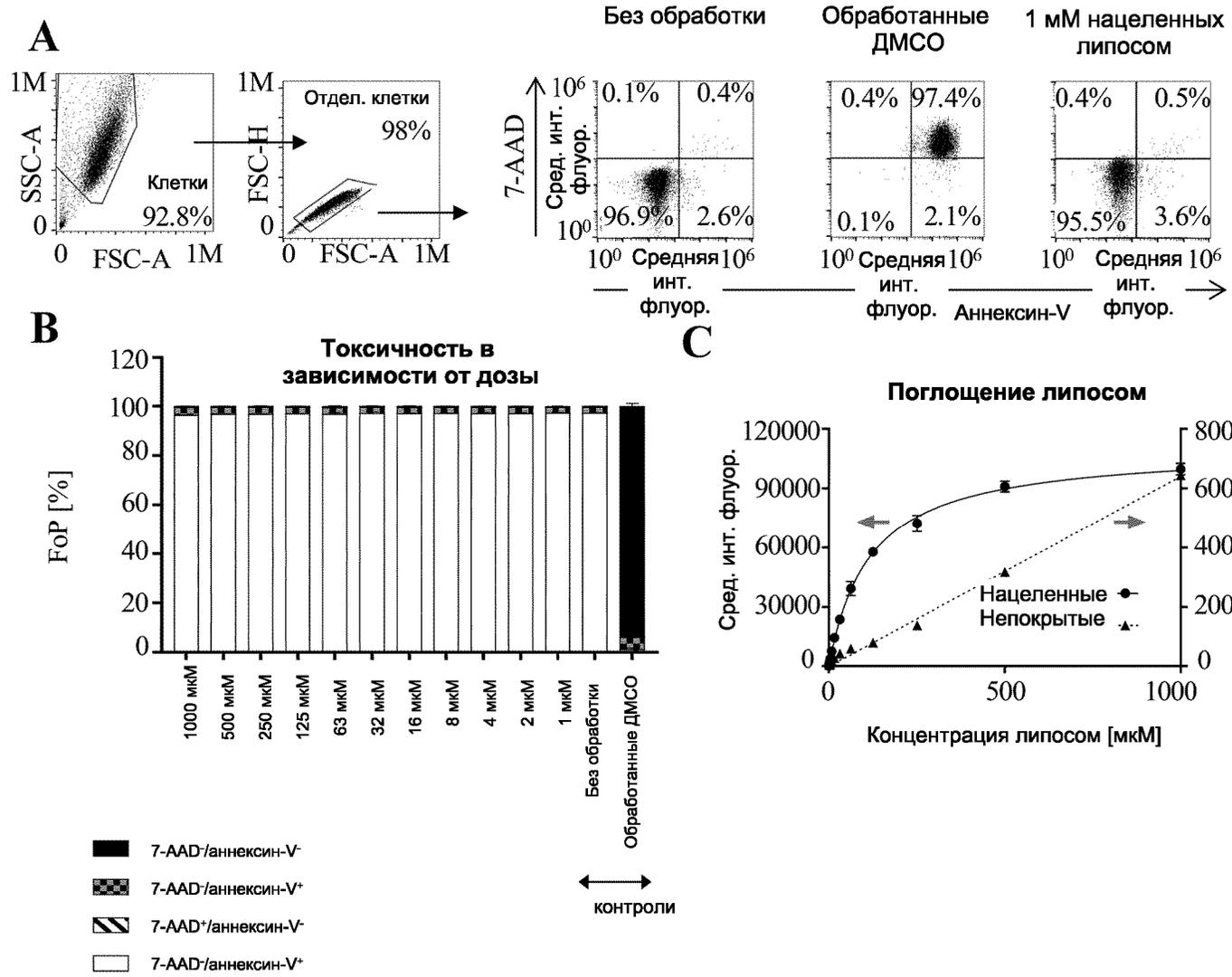
ФИГУРА 15



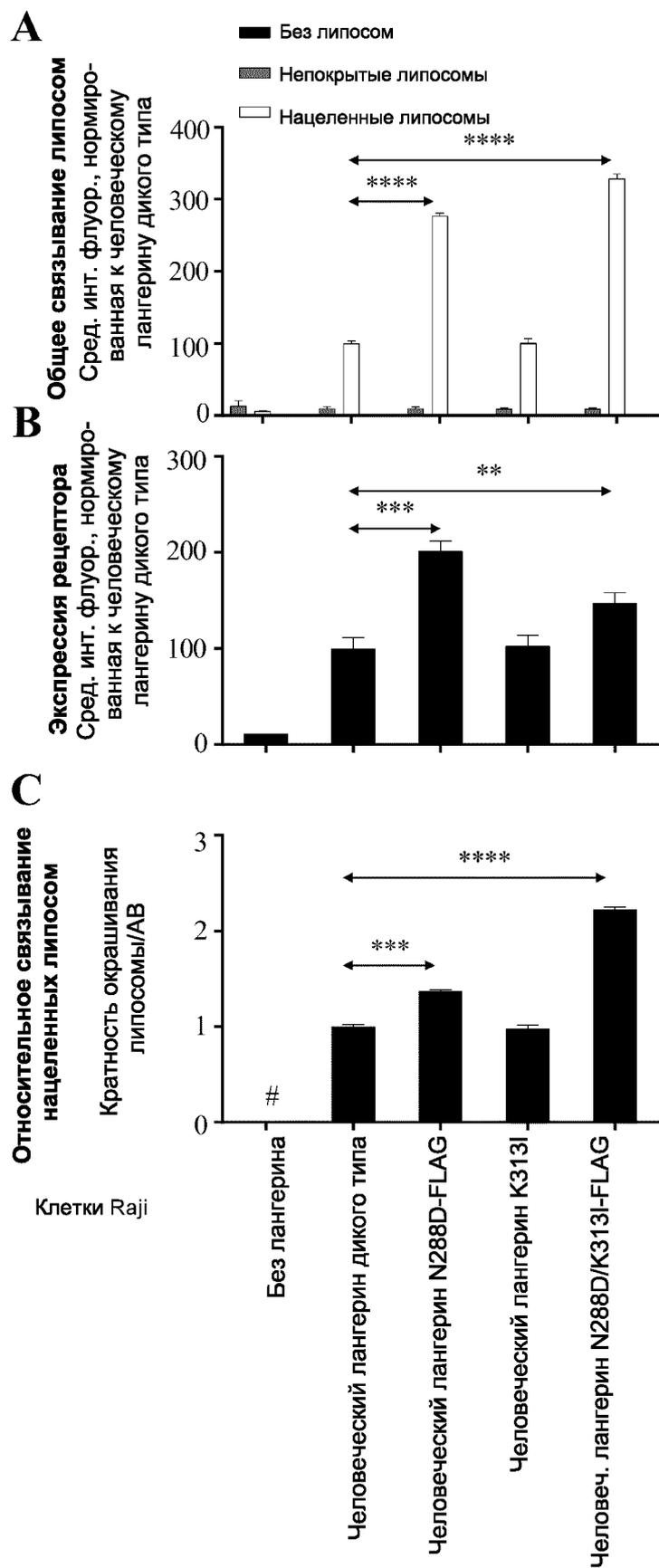
ФИГУРА 16



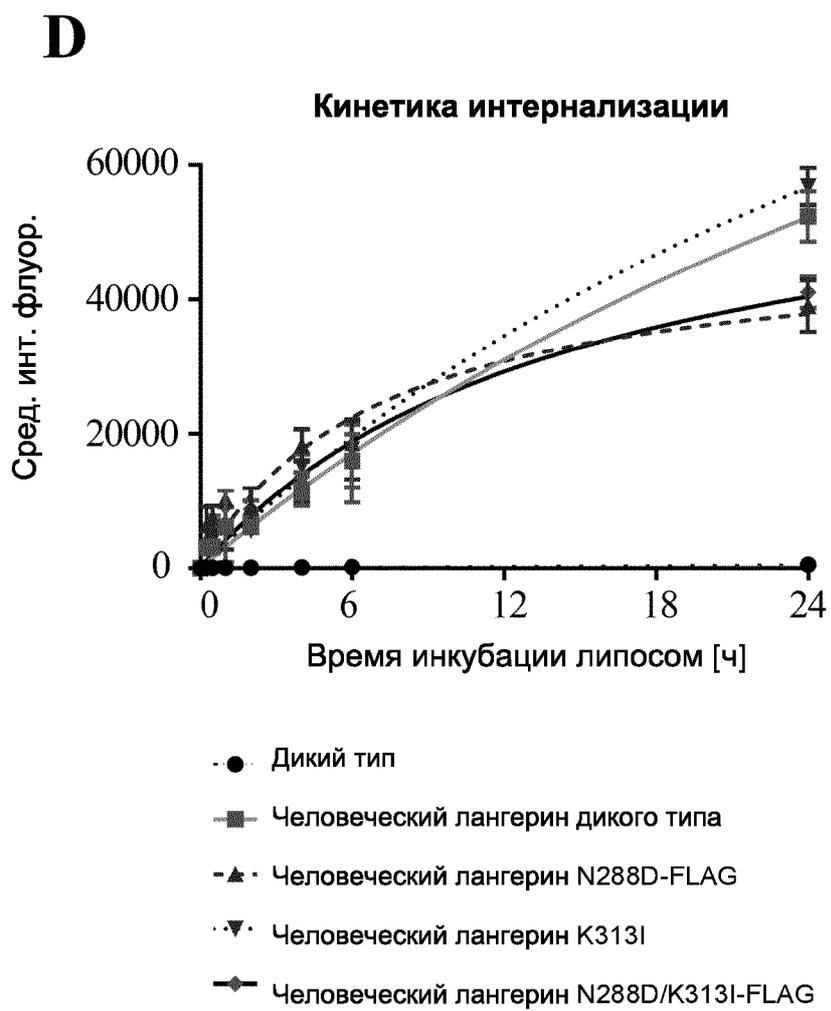


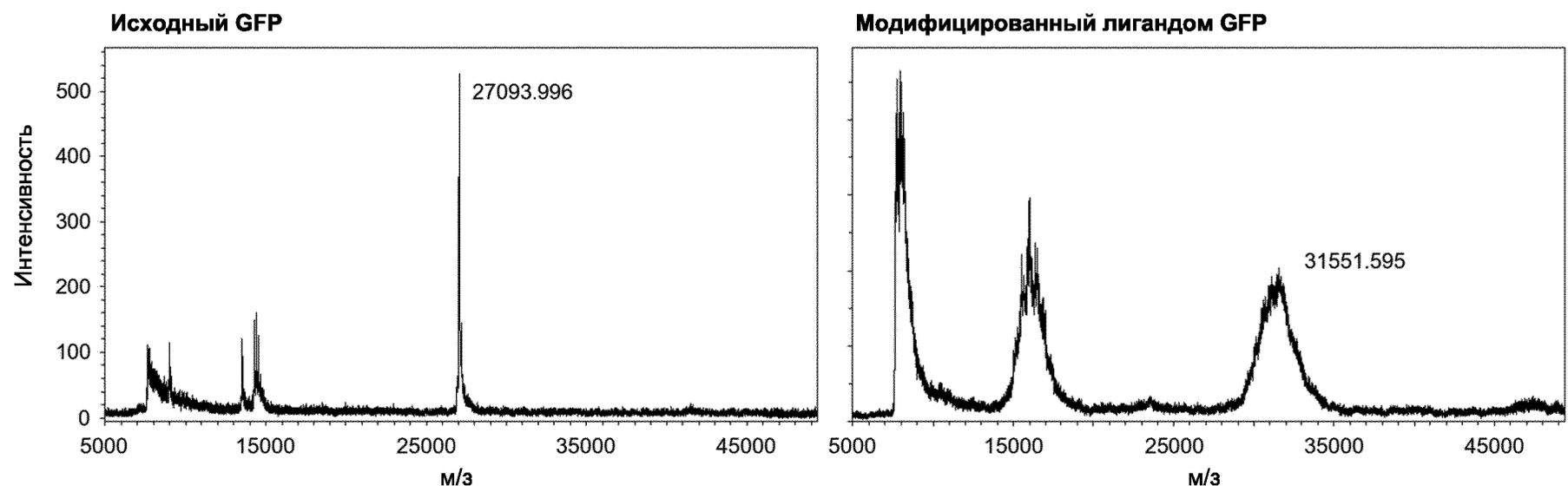


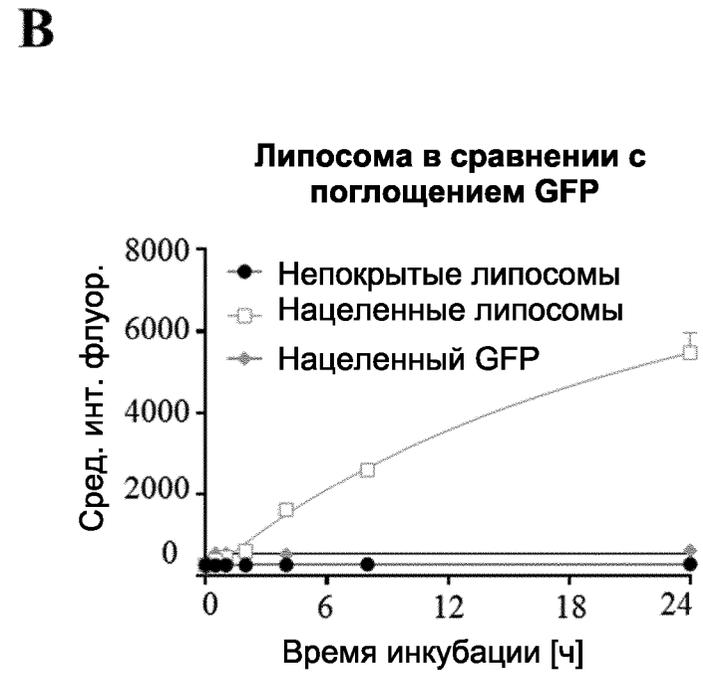
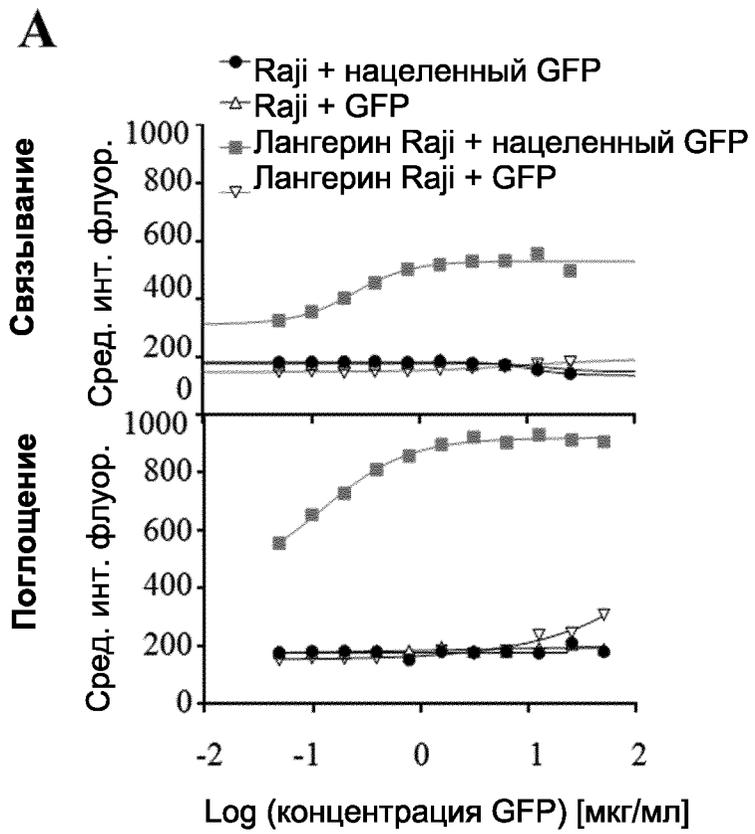
ФИГУРА 19А-С

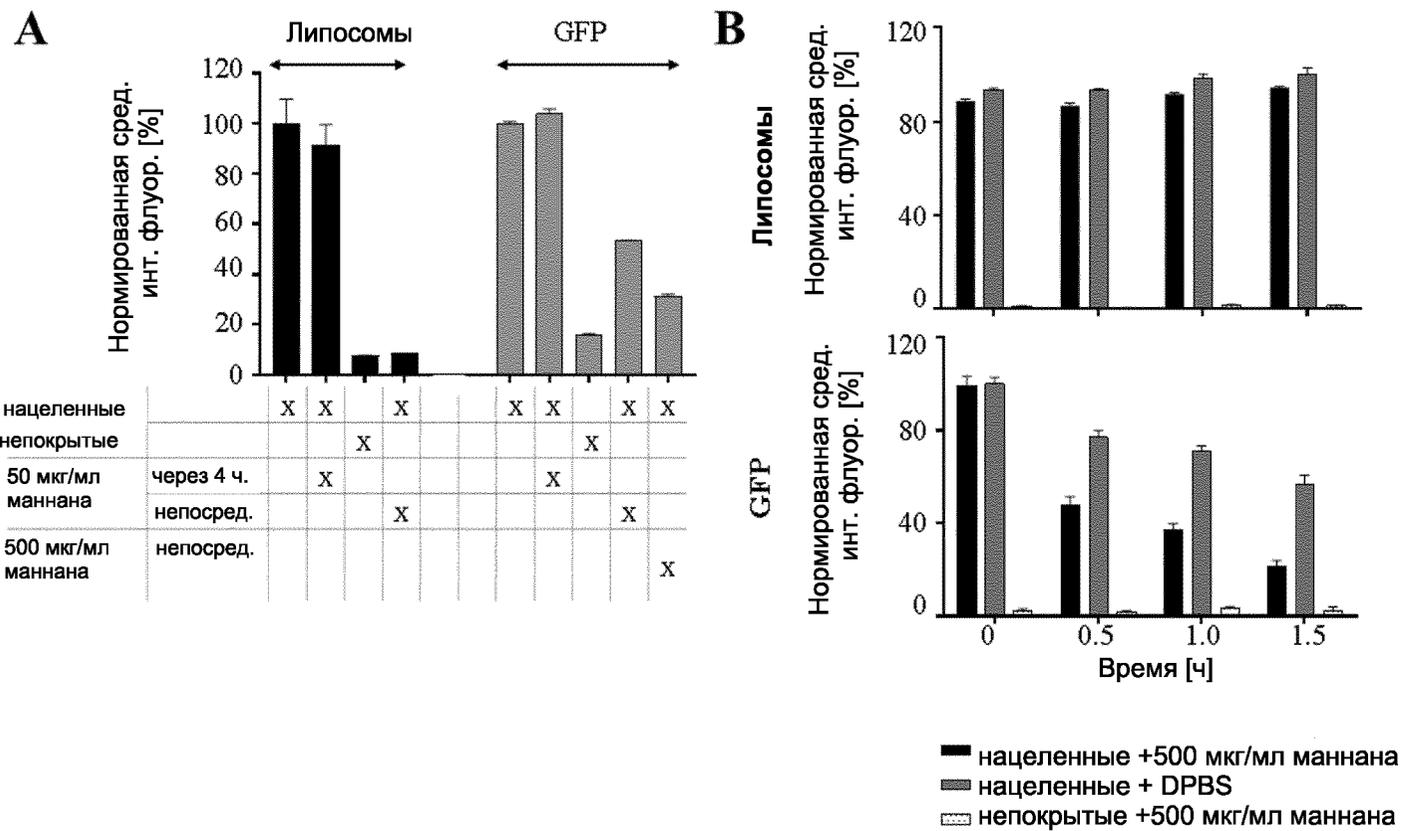


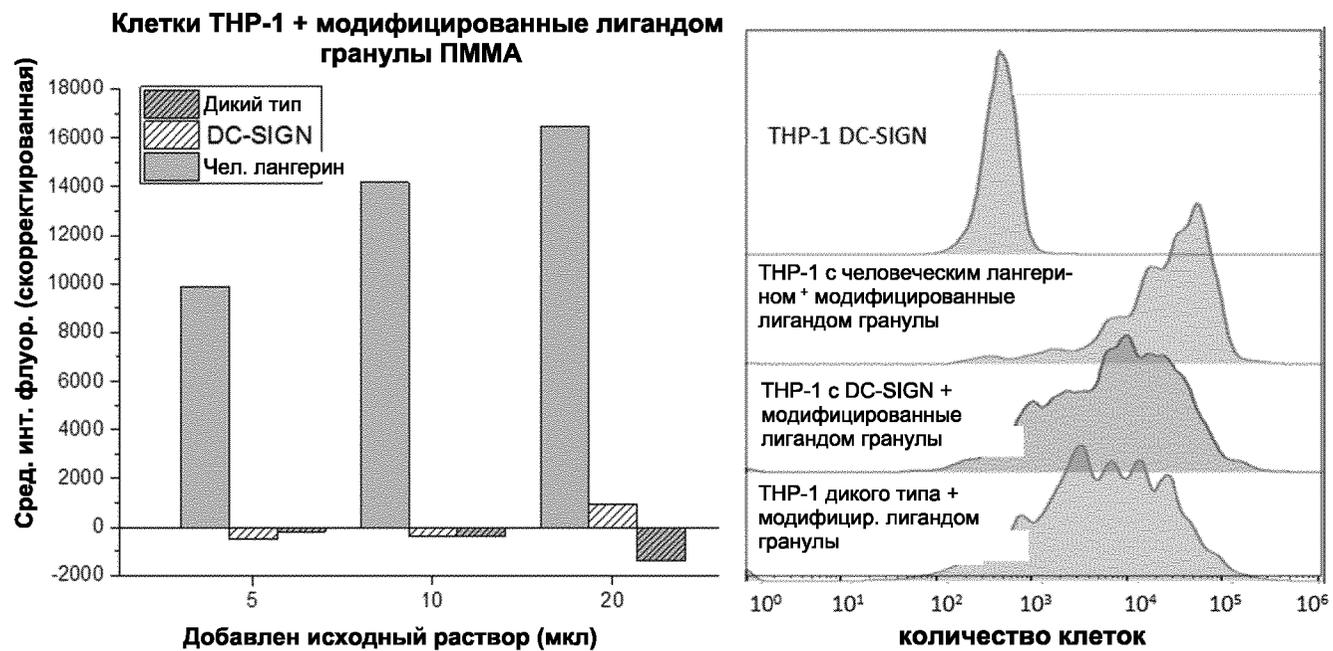
ФИГУРА 19D



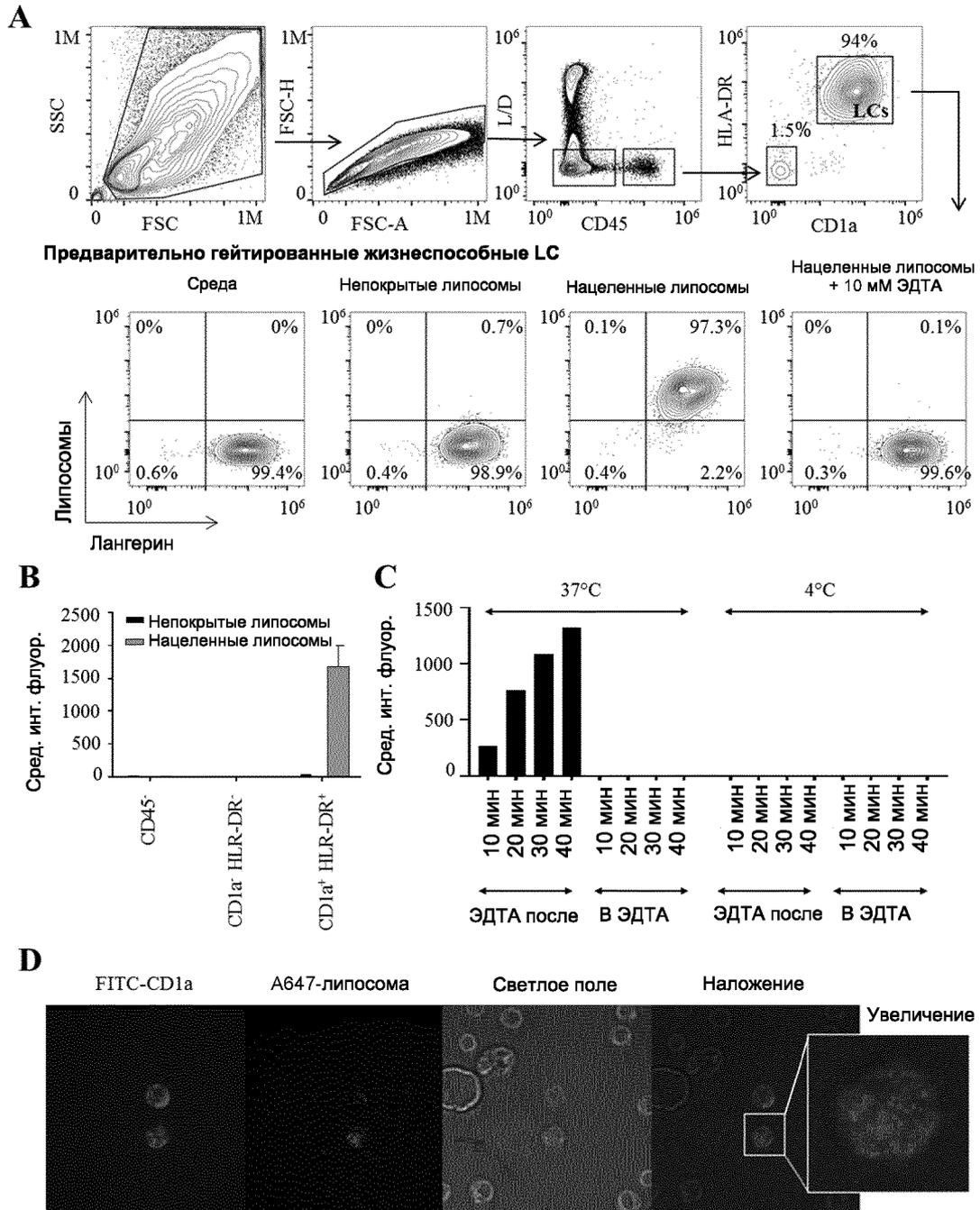


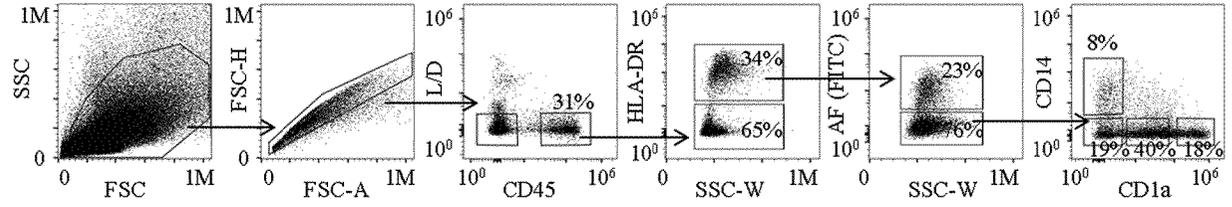




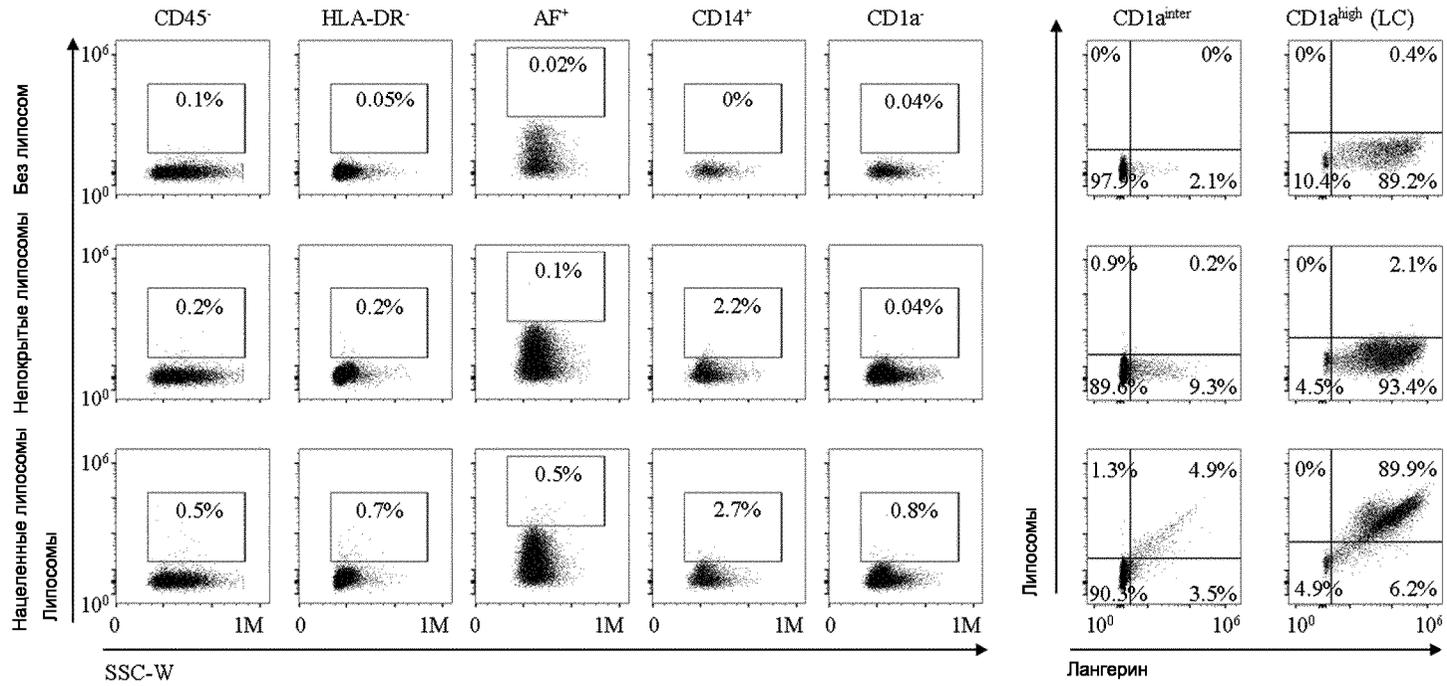


ФИГУРА 24

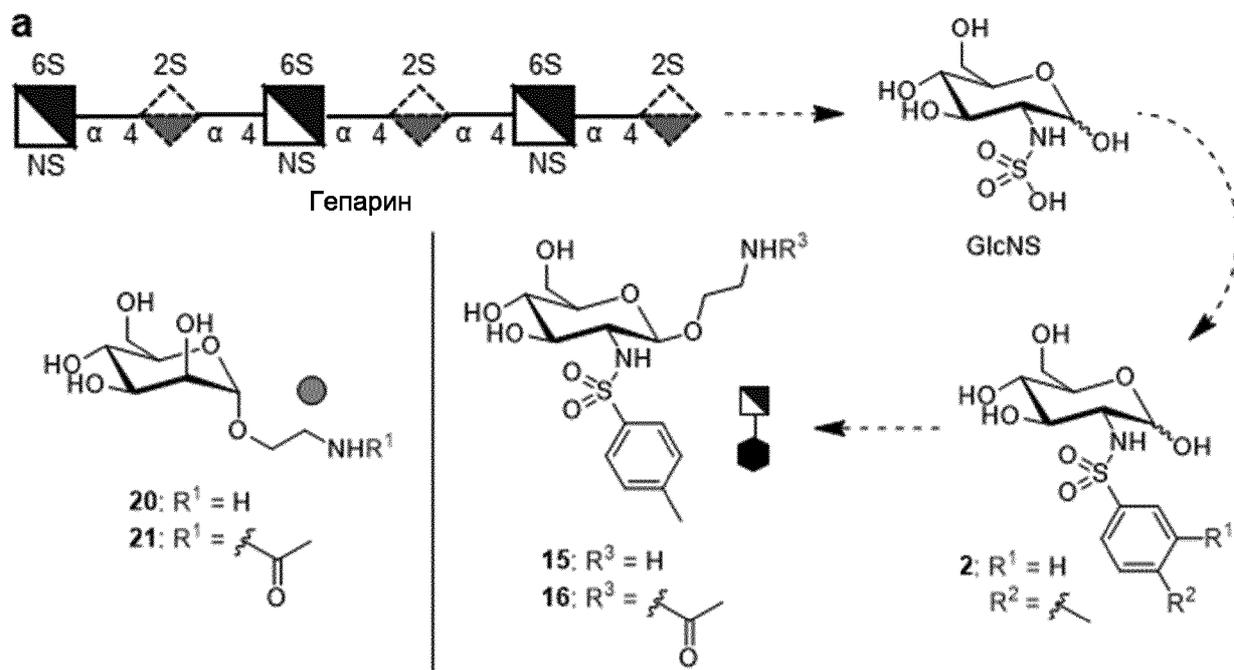
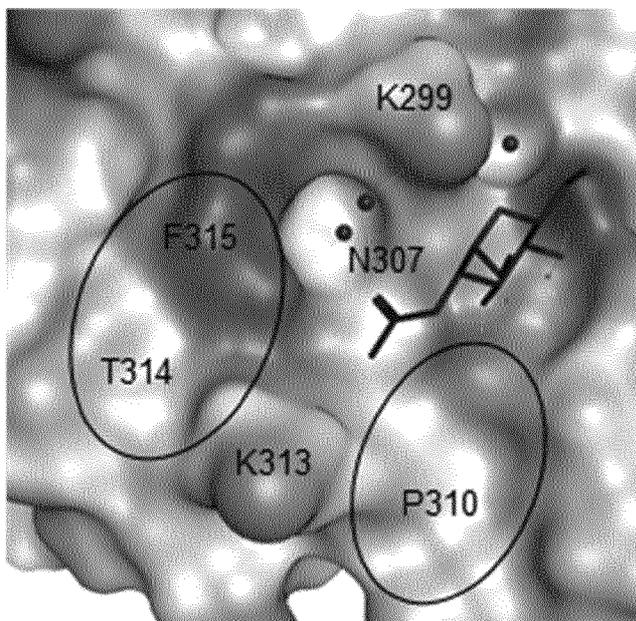




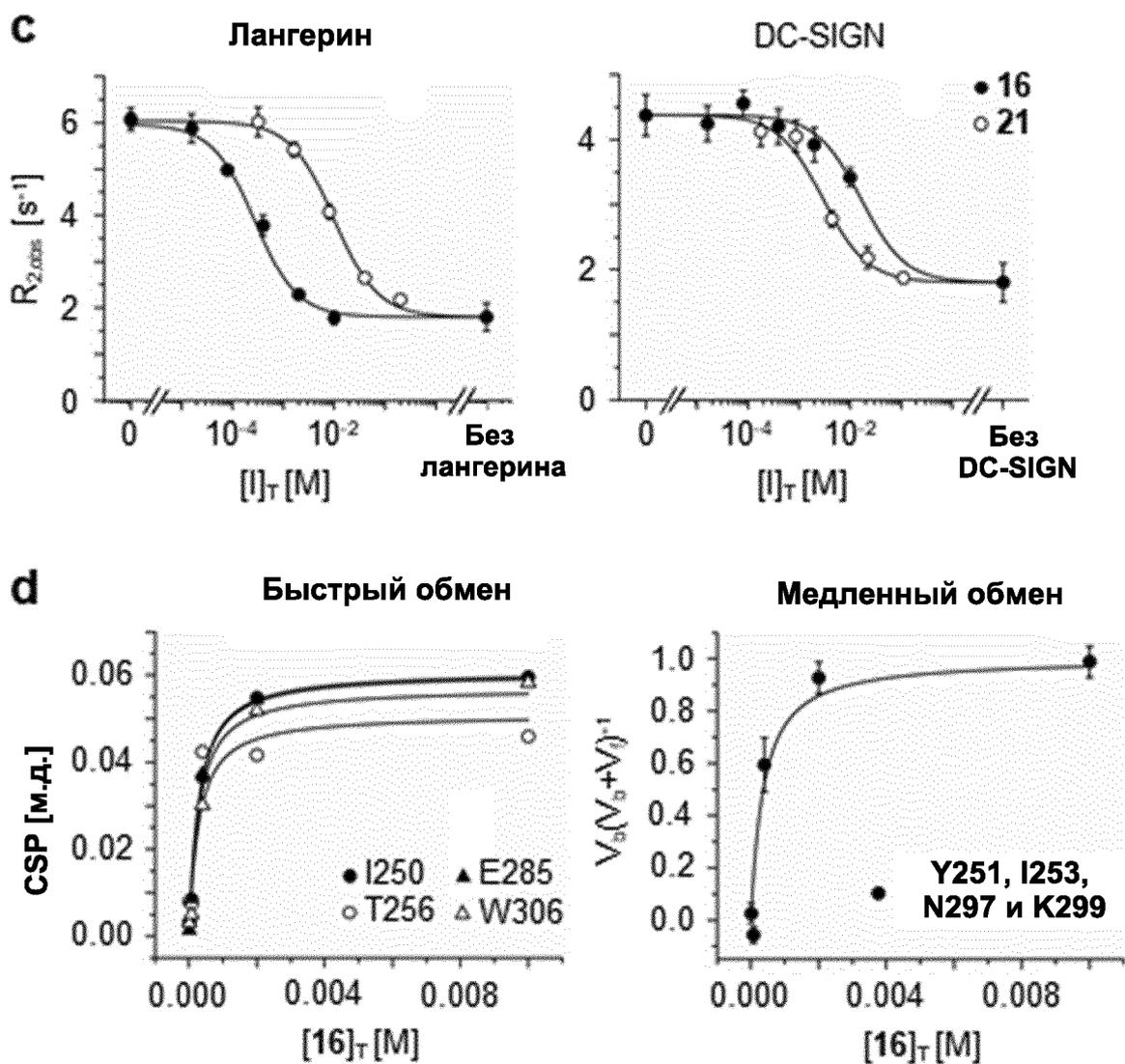
Предварительно гейтированные:



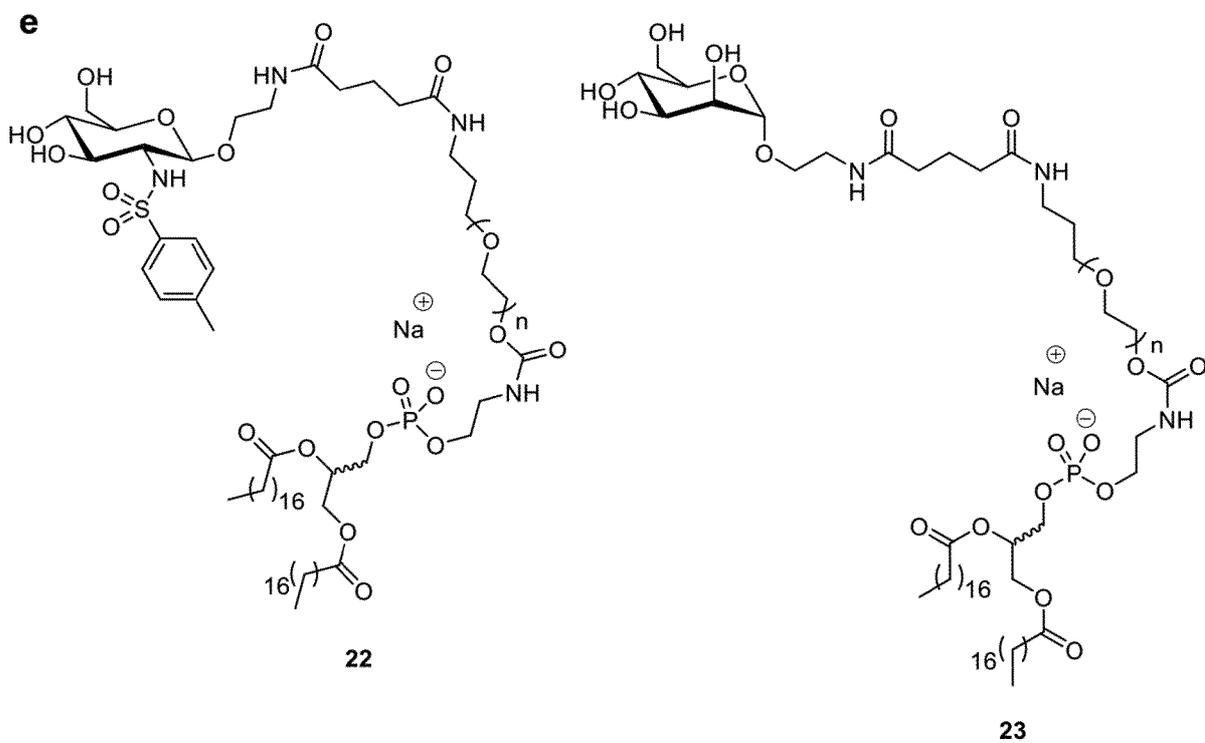
ФИГУРА 27a+b

**b**

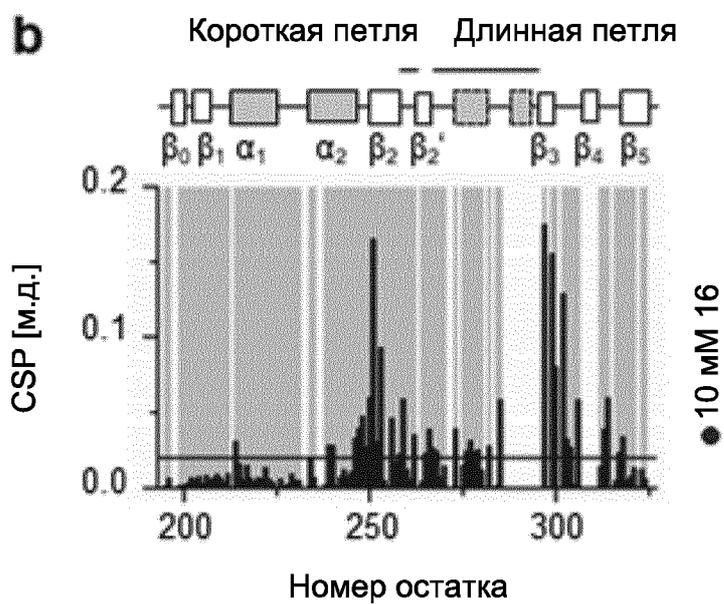
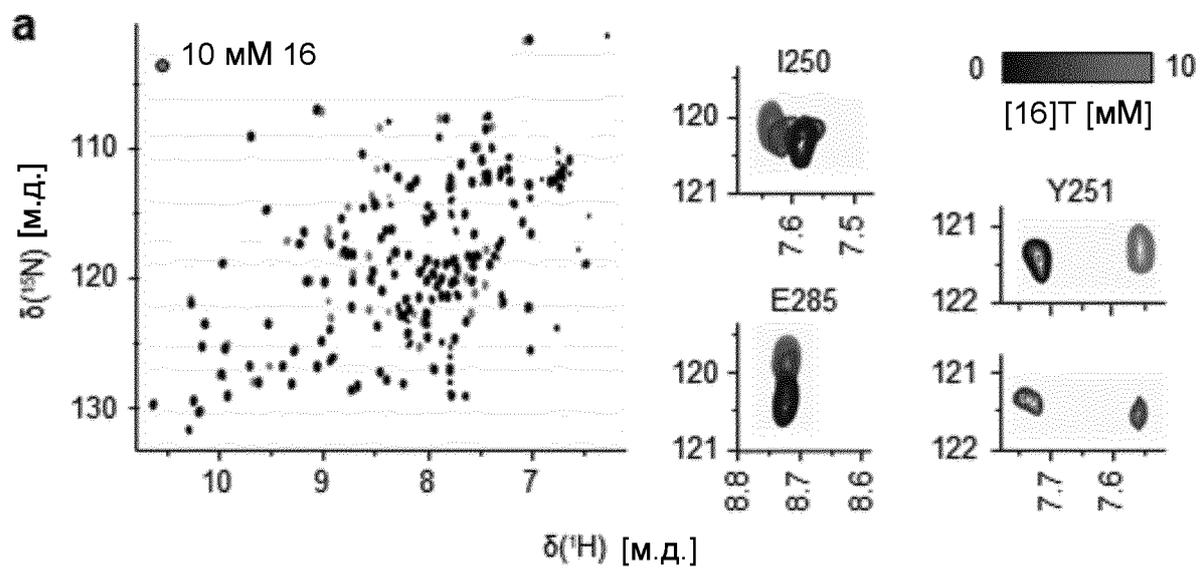
ФИГУРА 27c+d



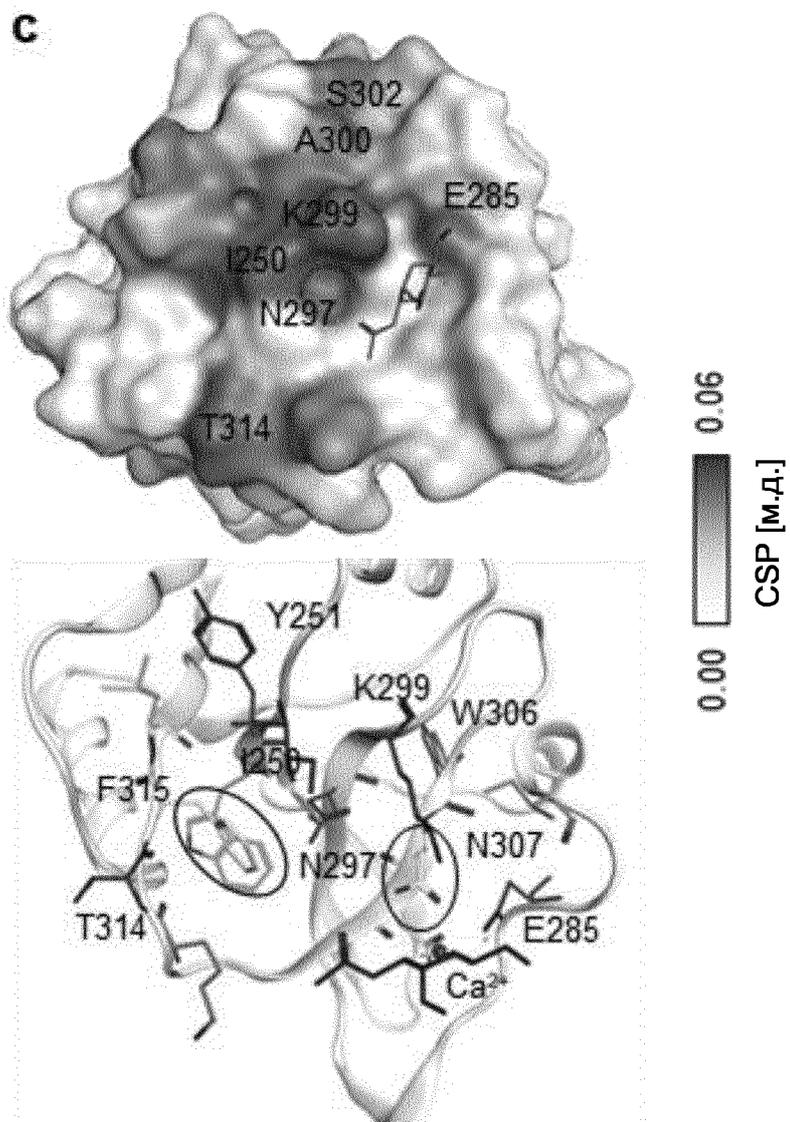
ФИГУРА 27е



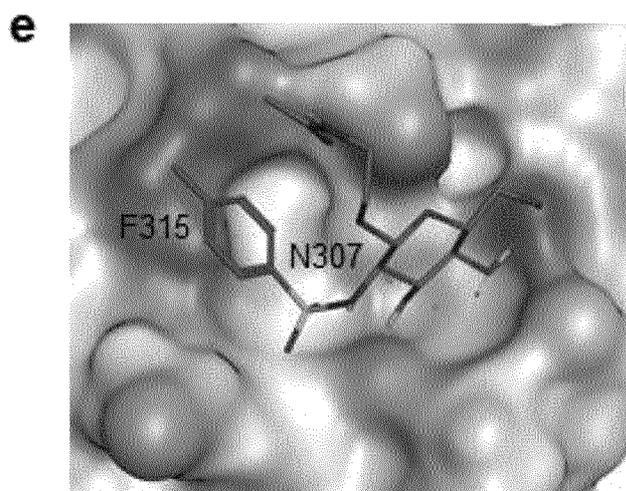
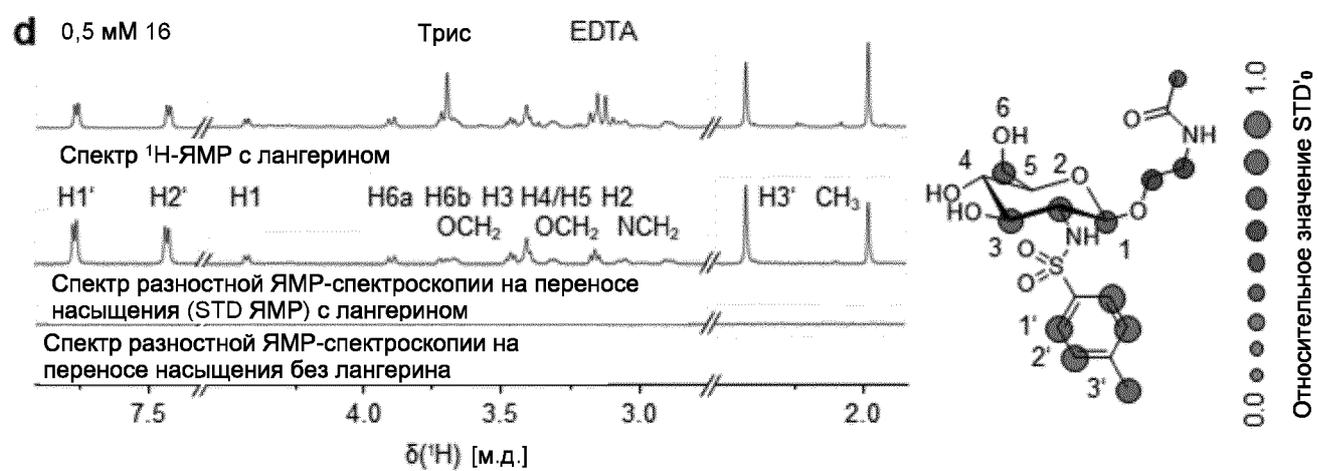
ФИГУРА 28a+b



ФИГУРА 28с



ФИГУРА 28d+e



Взаимосвязь структуры с активностью и специфичность в отношении DC-SIGN

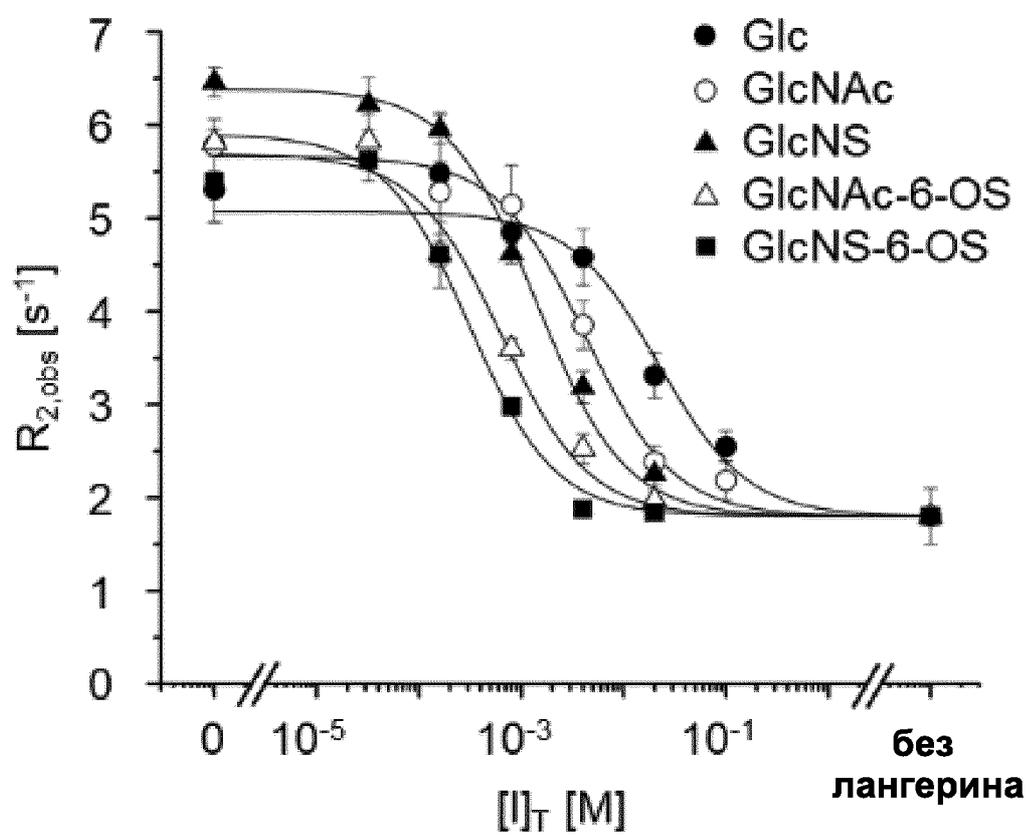
Структура	Лангерин			DC-SIGN	
	K _i [мМ]	K _D [мМ]	Относительная эффективность ^a	K _i [мМ]	Специфичность
2	0.32±0.0	0.46±0.04	31	17±1	53
	5	0.5±0.2 ^b			
16	0.24±0.0	0.23±0.07	42	15±3	63
	3	0.3±0.1 ^b			
Манноза	4.5±0.5 ^c	6.5±0.2 ^c	2.2	3.0±0.3	0.67
21	10±1	12±1	1.0	2.7±0.3	0.27

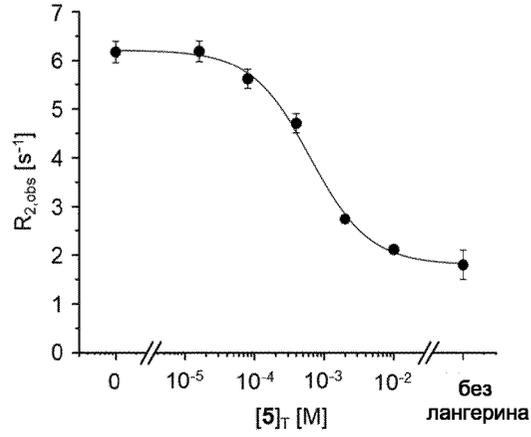
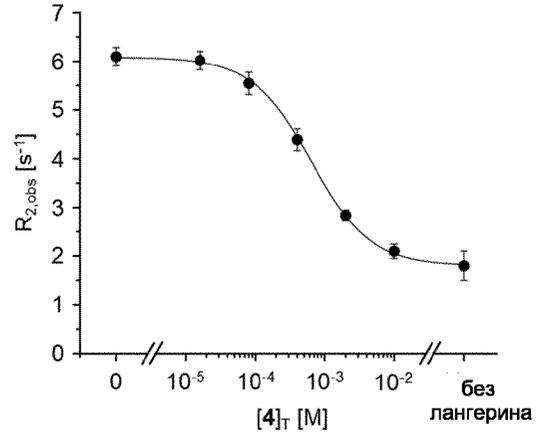
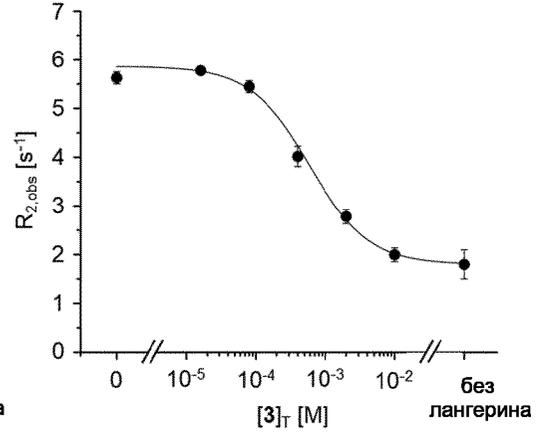
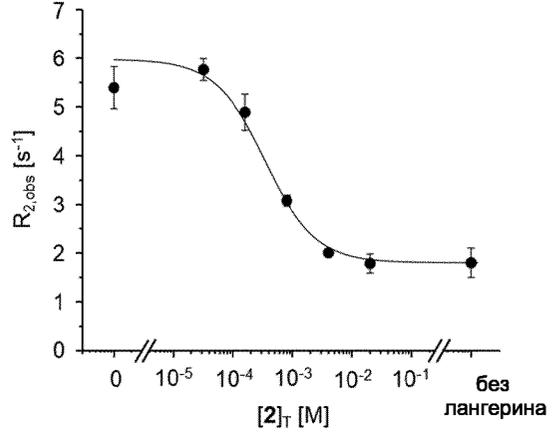
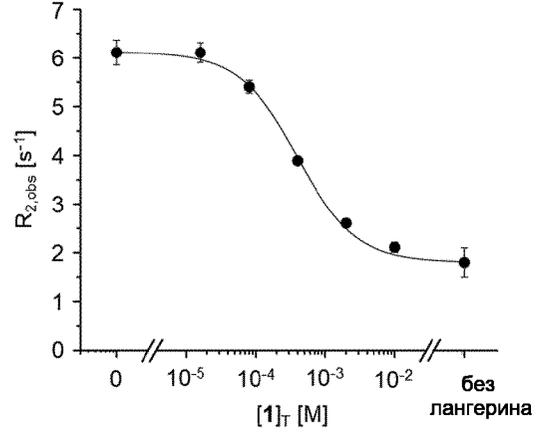
^a Относительная эффективность была рассчитана с использованием значения K_i, определенного для **21**.

^b Значение было определено на основании интегралов V резонансов, наблюдаемых при медленном обмене.

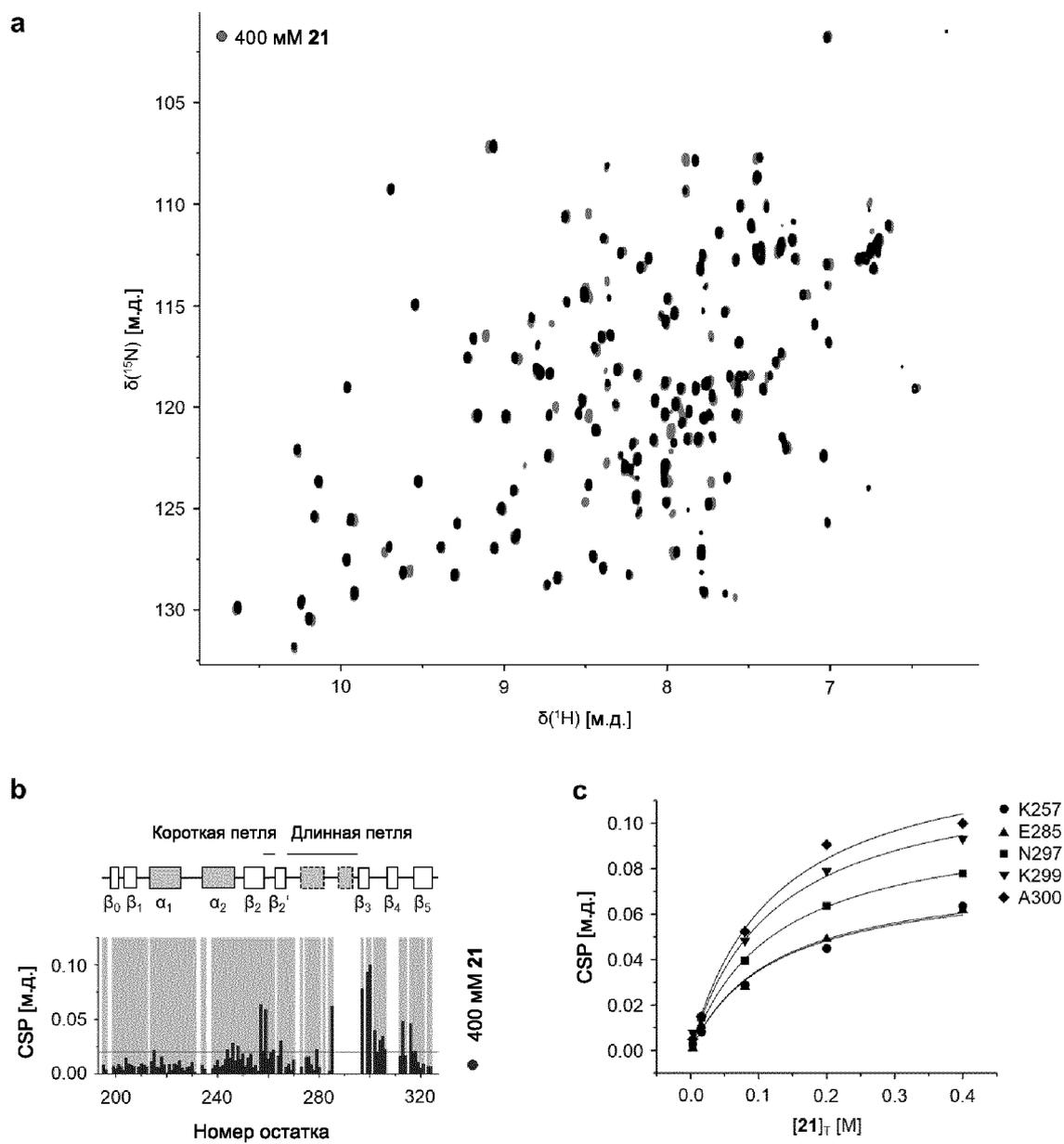
^c Значение было опубликовано ранее⁵⁰.

ФИГУРА 30

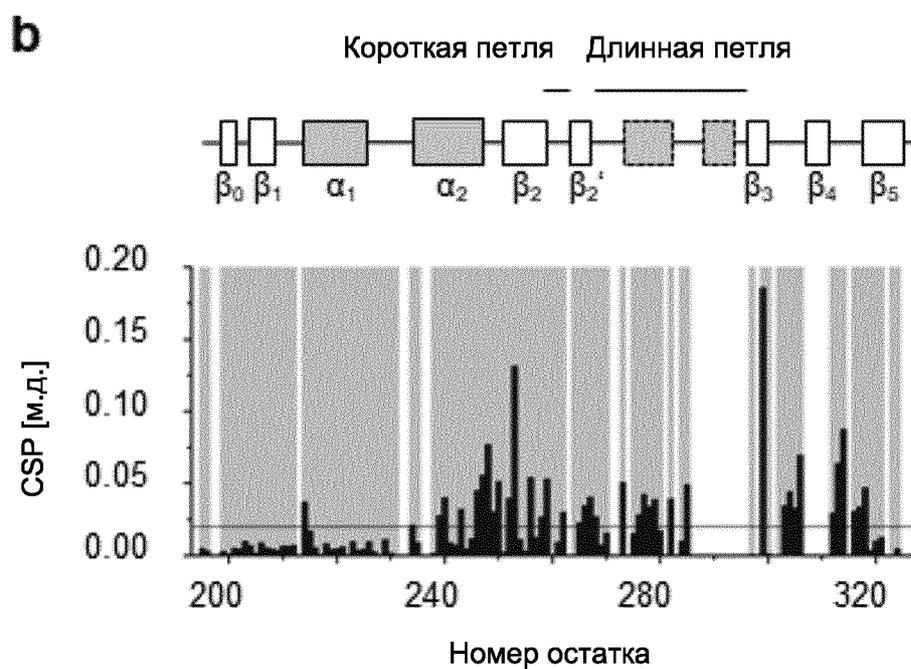
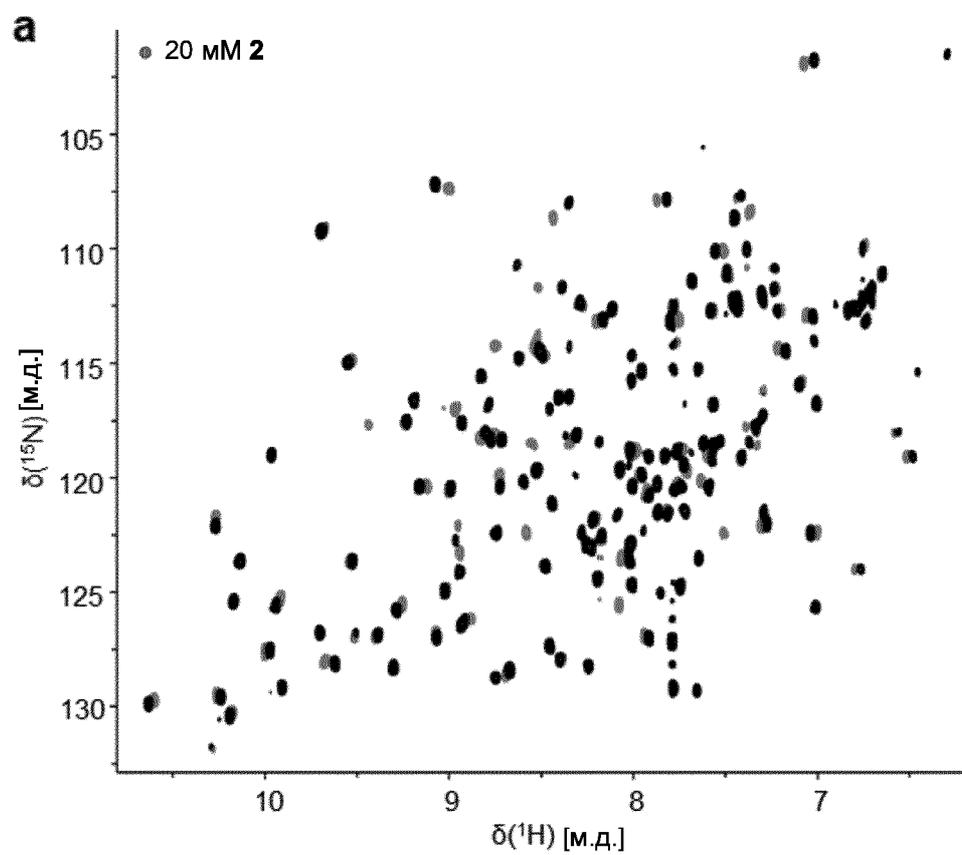




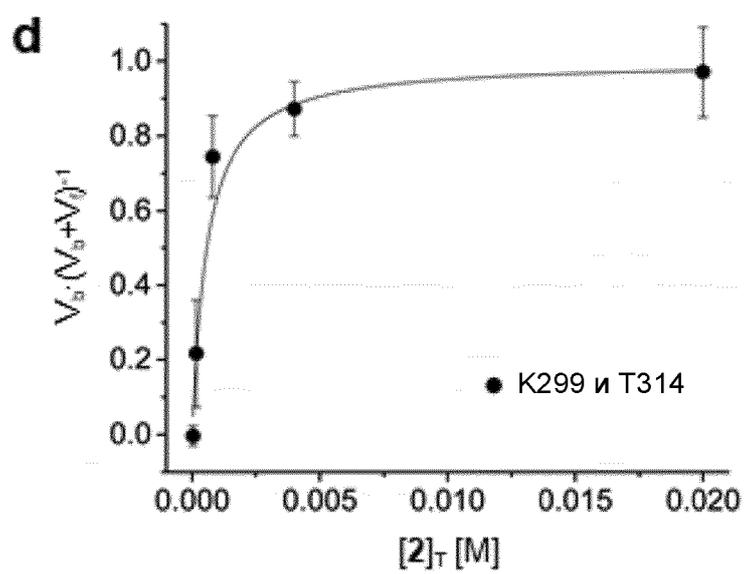
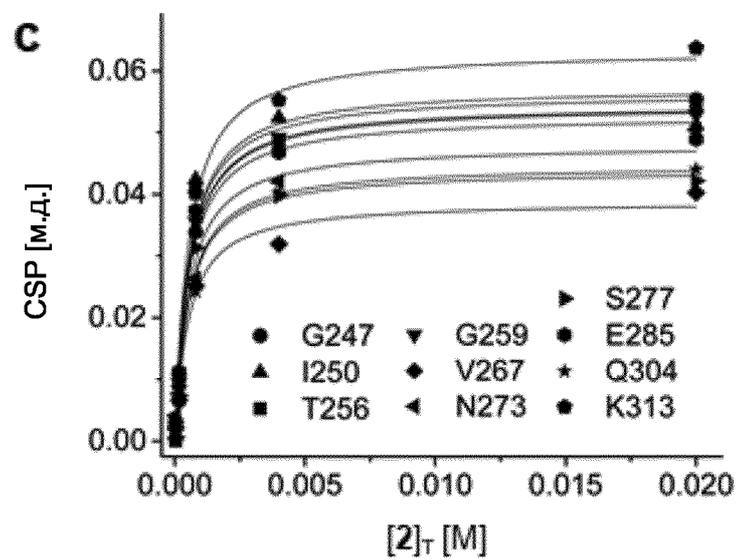
ФИГУРА 32

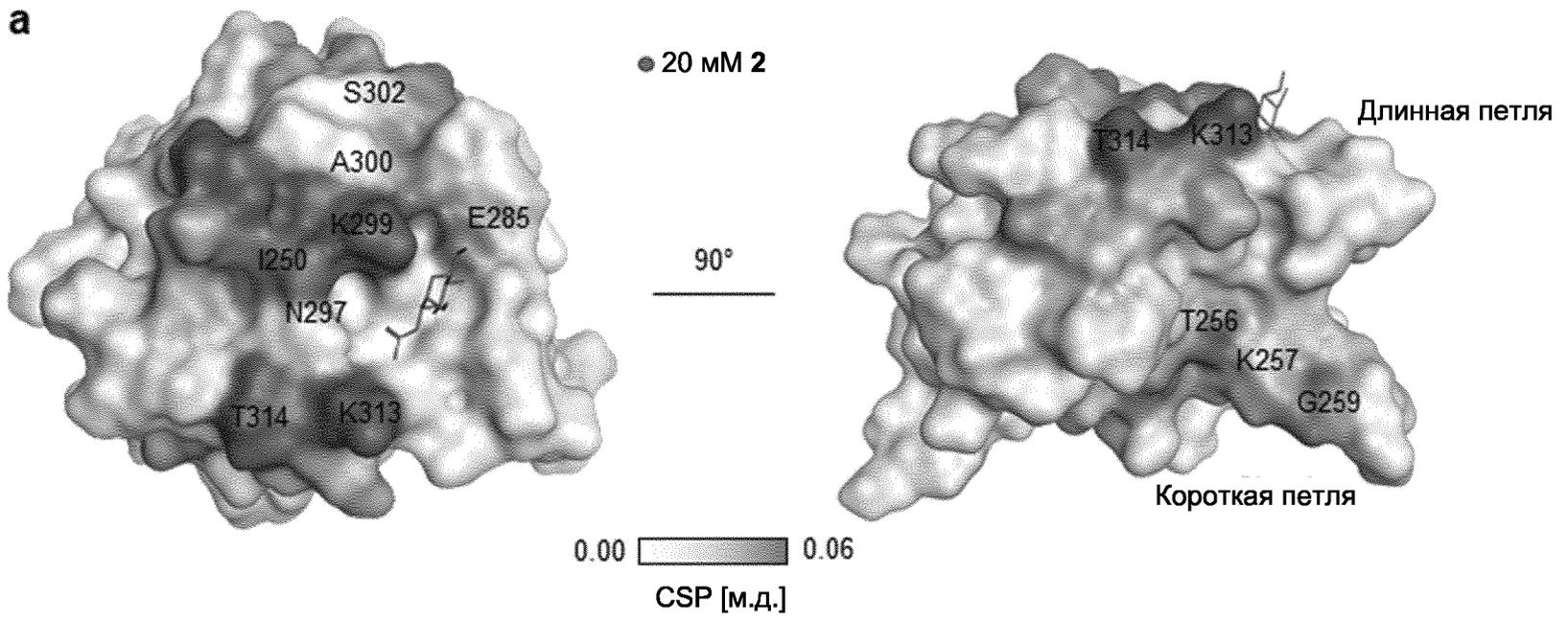


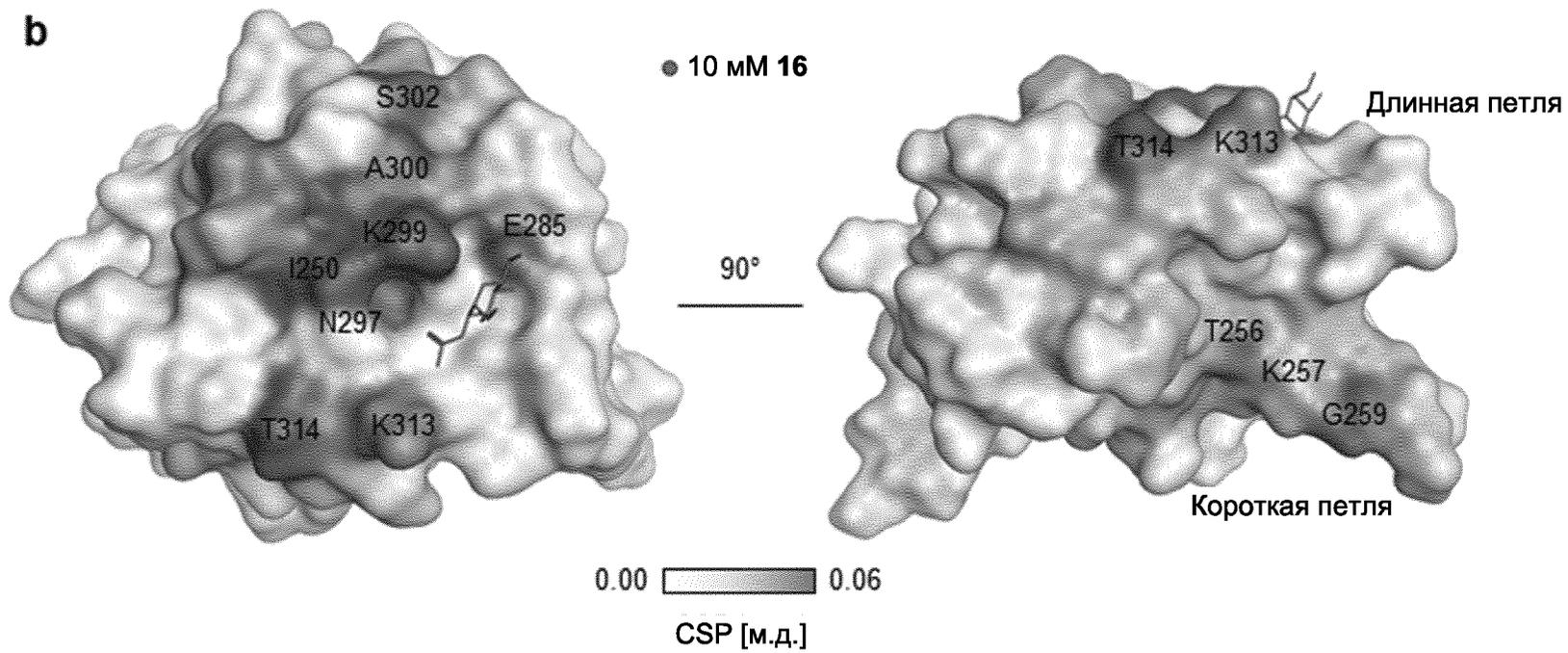
ФИГУРА 33a+b

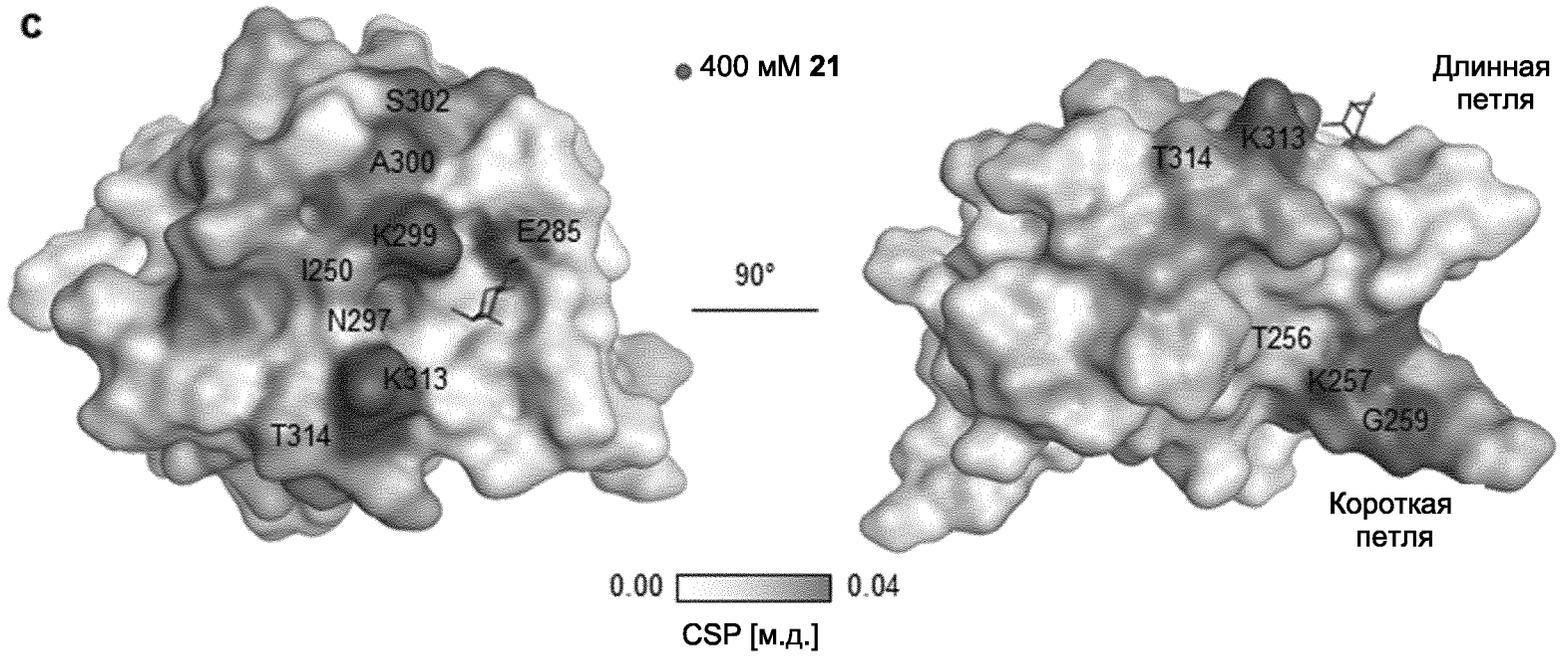


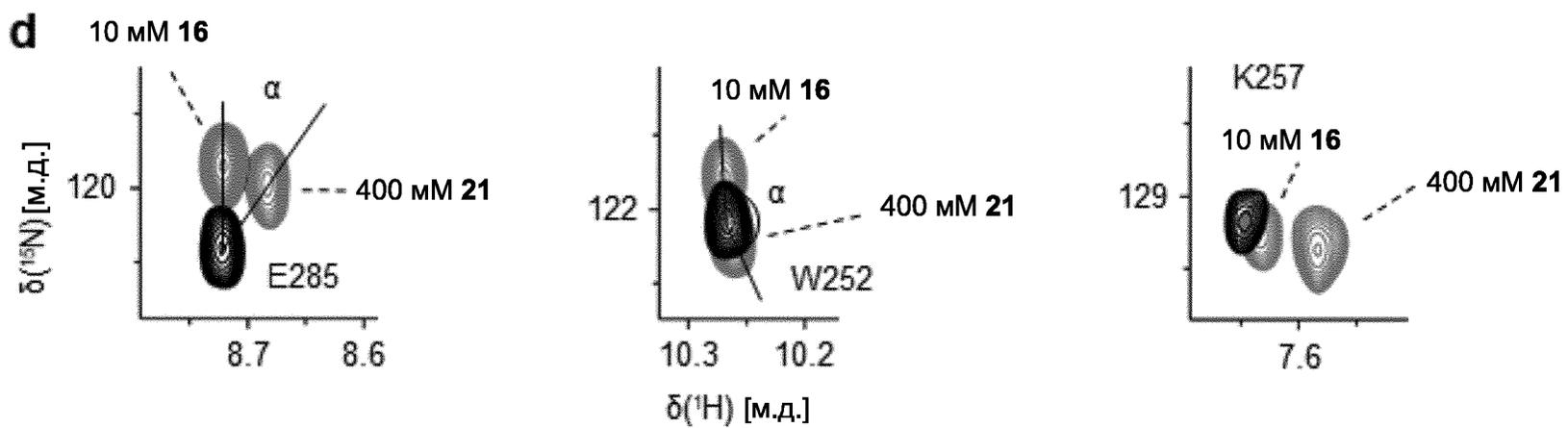
ФИГУРА 33с+d



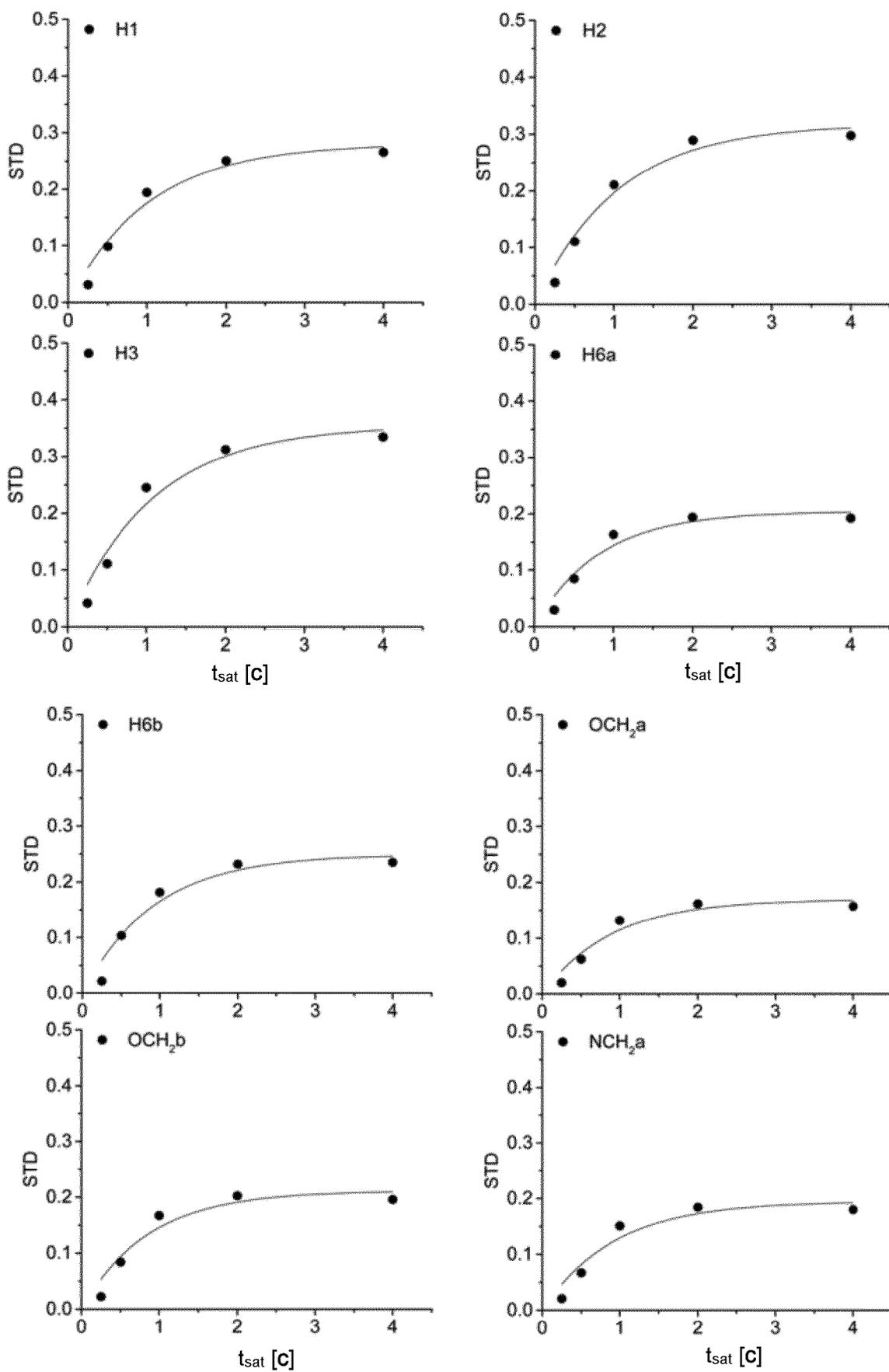




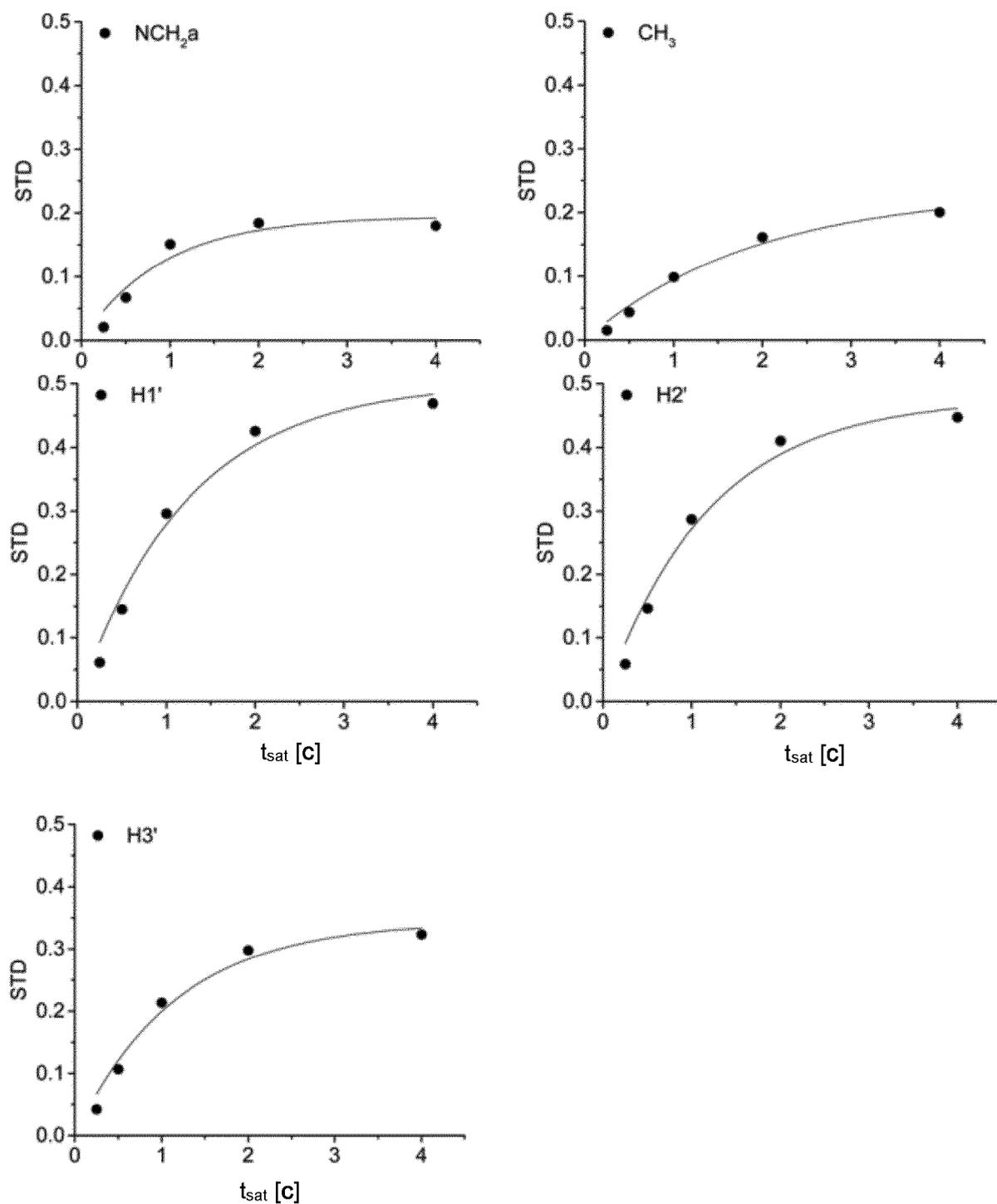




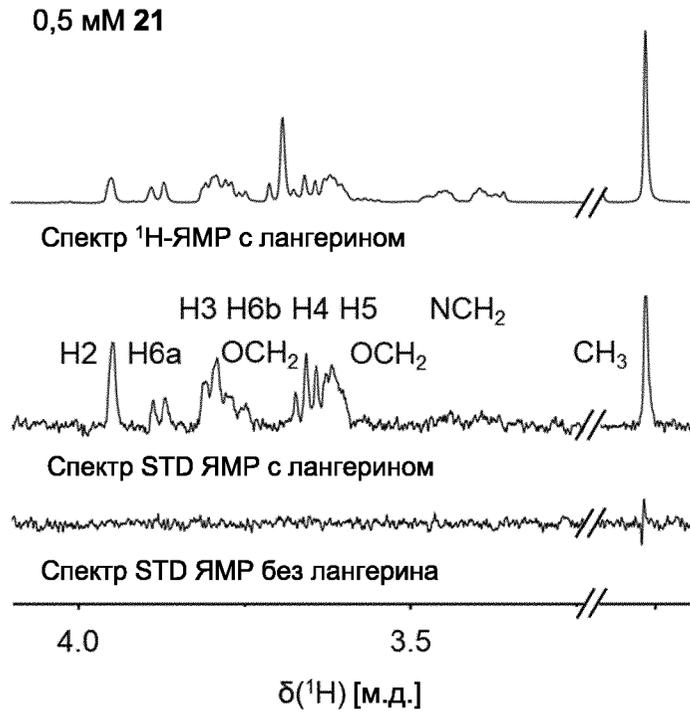
ФИГУРА 35-1



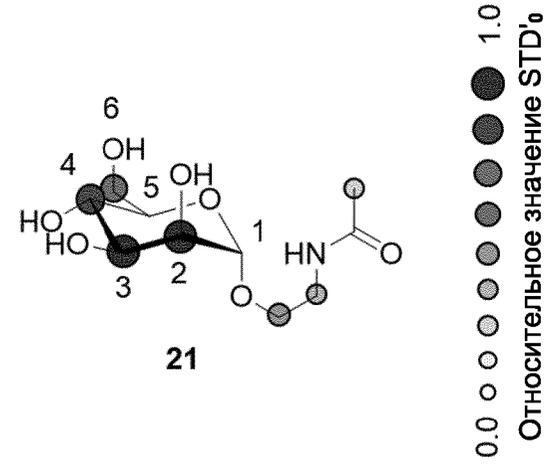
ФИГУРА 35-2



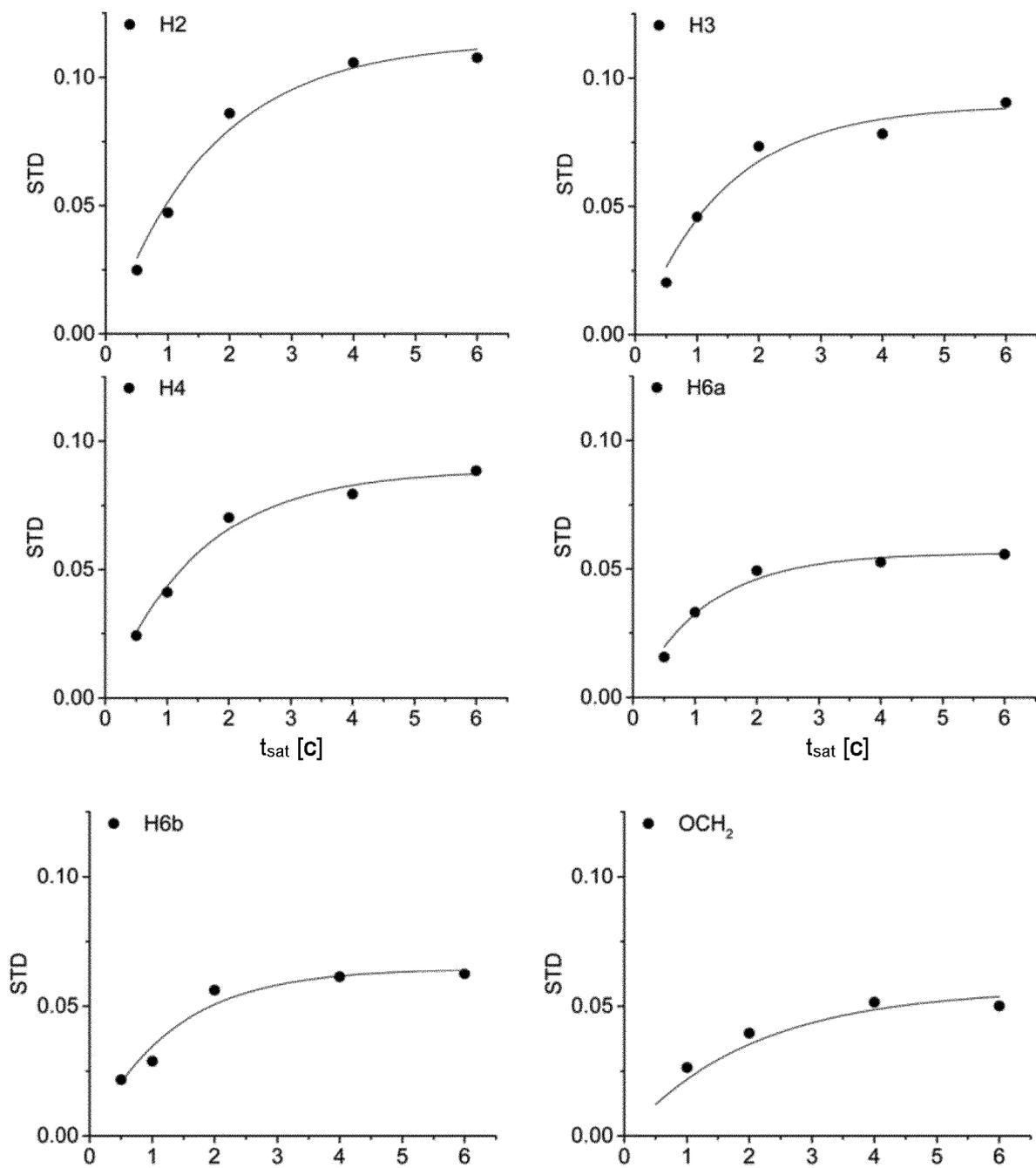
a



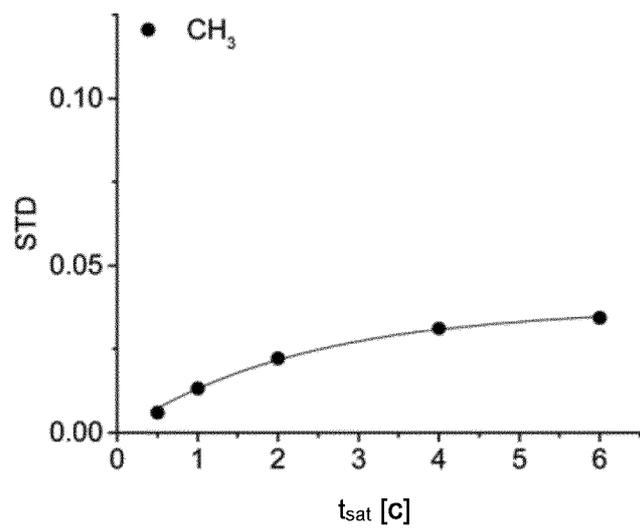
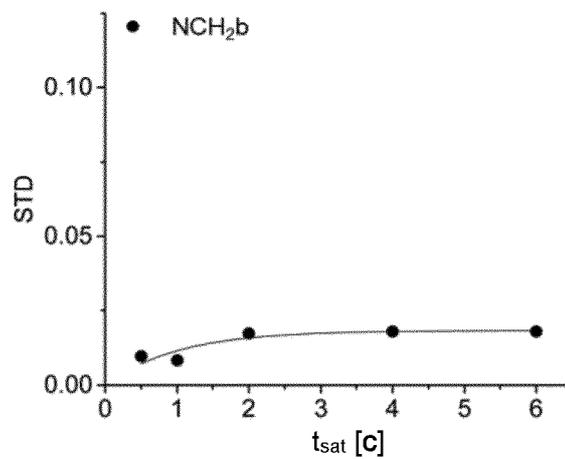
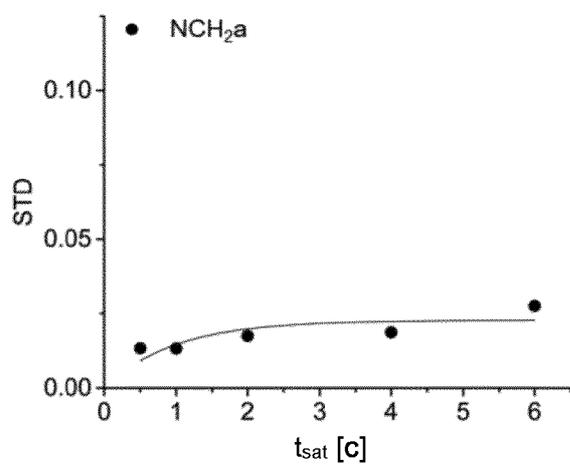
b

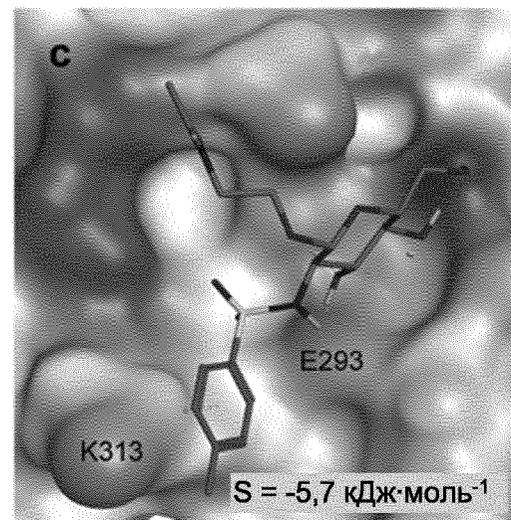
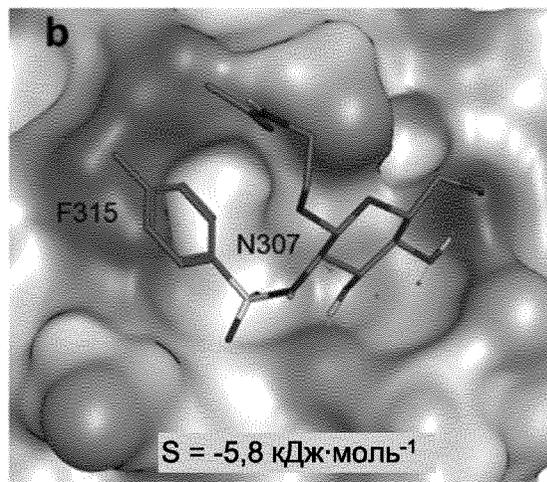
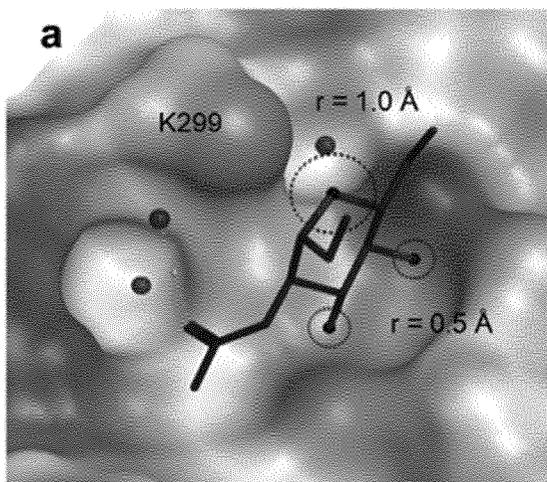


ФИГУРА 37-1

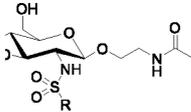
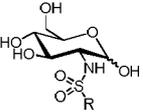
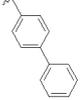
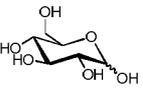
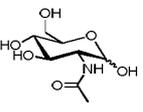
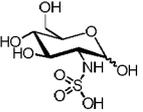
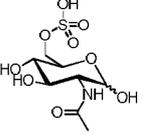
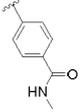
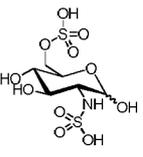


ФИГУРА 37-2





ФИГУРА 39

Структура	R	K _i [мМ]	Структура	R	K _i [мМ]
		0,24±0,03			0,37±0,04
		0,41±0,14			0,32±0,05
		0,74±0,23			0,56±0,09
		1,06±0,77			0,60±0,02
		0,53±0,21			0,59±0,06
		0,10±0,02			21±4
		0,21±0,05			4,1±0,7
		1,24±0,69			1,4±0,02
		0,21±0,01			0,6±0,1
		0,33±0,01			0,28±0,06