

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292366 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.10

(22) Дата подачи заявки
2021.02.16

(51) Int. Cl. A61K 9/107 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) АМФИФИЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ
ДОСТАВКИ АНТИГЕНОВ

(31) 20157797.0

(32) 2020.02.17

(33) EP

(86) PCT/EP2021/053711

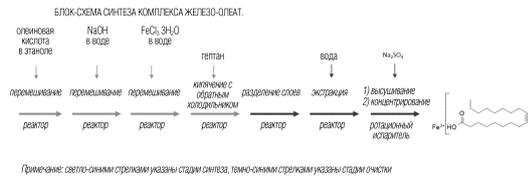
(87) WO 2021/165227 2021.08.26

(71) Заявитель:
ТОПАС ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Дихигоу Рейнальдо, Мунгалпара
Диша, Польнер Йоханнес, Селеджи
Мухаррем (DE)

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

(57) Изобретение относится к наночастицам, содержащим а) мицеллу, содержащую амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (Mn) 20000 г/моль или менее, и б) по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим эти наночастицы, и к применению этих композиций для подавления специфического иммунного ответа.



202292366

A1

A1

202292366

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 575227EA/025

АМФИФИЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ АНТИГЕНОВ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к наночастицам для применения для предупреждения и лечения аутоиммунных заболеваний, аллергии или других хронических воспалительных состояний, и для получения регуляторных Т-клеток. В частности, настоящее изобретение относится к наночастицам, содержащим мицеллу, содержащую амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, который придает наночастице растворимость в воде, и по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей наночастицы. Фармацевтическая композиция может использоваться для получения регуляторных Т-клеток, специфичных по меньшей мере к одному Т-клеточному эпитопу у индивидуума, для лечения или предупреждения заболевания, при котором было бы полезным подавление специфического иммунного ответа.

Более того, настоящее изобретение относится к способу получения наночастиц.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аутоиммунные заболевания являются существенной проблемой для пациентов и систем здравоохранения. Современные способы терапии основаны по большей части на иммуносупрессивных лекарственных средствах с выраженными побочными эффектами. Аутоантиген-специфические способы иммунотерапии, которые нацелены исключительно на специфические для заболевания иммунные патологии, оставляя общий иммунный статус неизменным, являются неудовлетворенной медицинской потребностью.

Иммунная толерантность к собственным антигенам поддерживается множеством механизмов, контролирующих потенциально патогенные аутореактивные лимфоциты, включая делецию, клональную анергию и супрессию регуляторными Т-клетками. Таким образом, аутоиммунное заболевание может быть результатом недостаточного контроля аутореактивных лимфоцитов, и основной целью иммунотерапии аутоиммунных заболеваний является индукция толерантности к аутоантигенам путем восстановления регуляции. Особенно перспективным способом восстановления толерантности к своему, по-видимому, является манипулирование аутоантиген-специфическими CD4+CD25+FOXP3+ Т-регуляторными клетками. Адоптивный перенос этих клеток может препятствовать аутоиммунным или воспалительным состояниям.

Печень играет центральную роль в подавлении нежелательных иммунных ответов против переносимых кровью антигенов, например, пищевых антигенов, попадающих в кровотоки. Этот фундаментальный механизм печени может использоваться для специфического подавления вредоносных иммунных ответов против внешних белковых

антигенов или аутоантигенов. Антигенные пептиды, происходящие из таких белков, когда они связаны с носителями наноразмера и введены внутривенно, имитируют пищевые антигены, запуская поглощение специфическими клетками печени, синусоидальными эндотелиальными клетками печени (LSEC), с последующим толерогенным иммунным ответом. Таким образом, может быть индуцирована пептид-специфическая иммунная толерантность, направленная на определенные вызывающие иммунное заболевание антигены, вызывая смягчение или даже устранение неблагоприятных иммунных реакций. Таким образом, этот подход может использоваться для лечения имеющихся заболеваний и также может использоваться для предупреждения соответствующих заболеваний в ходе профилактики.

Например, эктопическая экспрессия нейроантигена в печени может предупреждать аутоиммунное нейровоспаление у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (EAE), модели рассеянного склероза на животных (MS). Эти данные могут быть объяснены способностью печени образовывать нейроантиген-специфические регуляторные Т-клетки (Treg), которые имеют выраженную способность контролировать и подавлять аутоиммунный ответ. LSEC играют ключевую роль в достижении этого эффекта. LSEC экспрессируют молекулы МНС/HLA класса I и класса II на их поверхности и, таким образом, обладают способностью презентировать пептиды как CD8⁺ (посредством перекрестной презентации), так и CD4⁺ Т-клеткам, соответственно. Презентация пептидного антигена посредством LSEC конвертирует наивные и эффекторные Т-клетки в Treg антигенспецифическим образом *in vitro*. По-видимому, это является физиологическим механизмом, посредством которого LSEC могут обеспечивать толерантность против переносимых кровью антигенов.

Наночастицы, конъюгированные со специфическим для заболевания антигенным пептидом на поверхности частицы, такие как переносимые кровью антигены, нацеливаются на печень после внутривенной инъекции. После поглощения LSEC, предположительно посредством пиноцитоза, наночастицы накапливаются в эндосомальном компартменте, где пептидные антигены высвобождаются с поверхности частиц. Это приводит к презентации этих антигенных пептидов на поверхности LSEC, опосредуемой молекулами МНС/HLA. Существуют данные о том, что следующее поколение Treg обеспечивает иммунную толерантность, специфичную к соответствующему аутоантигену, на основе его антигенных пептидных эпитопов.

В WO 2009/067349 описана фармацевтическая композиция, содержащая биосовместимую наночастицу, связанную с лигандом фактора транскрипции, арилугледородного рецептора (AHR), для применения для лечения аутоиммунных нарушений путем повышения количества и/или активности регуляторных Т-клеток.

В WO 2013/072051 описана фармацевтическая композиция для применения для получения регуляторных Т-клеток, специфичных по меньшей мере к одному Т-клеточному эпитопу, у индивидуума для лечения или предупреждения заболевания, где подавление специфического иммунного ответа является благоприятным. Наночастица

содержит мицеллу, содержащую амфифильный полимер, который придает наночастице растворимость в воде, и пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, связанный с наружной частью мицеллы. В общем, предлагается использовать коммерчески доступный полимер малеиновый ангидрид-alt-1-октадиен в качестве амфифильного полимера, имеющий молекулярную массу от 30000 до 50000 г/моль и чистоту приблизительно 90%.

Однако в определенных медицинских применениях является важным, чтобы наночастицы были получены с очень высокой степенью чистоты с использованием эффективных способов очистки.

В данной области все еще существует потребность в усовершенствованных наночастицах для лечения и предупреждения заболевания, где является благоприятным подавление специфического иммунного ответа, например, при аутоиммунных заболеваниях, при аллергии, при трансплантации, при супрессии антител против лекарственного средства (ADA), направленных против терапевтических средств или генных векторов, или при заболевании, где воспаление является чрезмерным, хроническим или неблагоприятным, и где указанная фармацевтическая композиция является пригодной для применения у человека.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением указанные выше проблемы решаются с помощью наночастицы, содержащей

- а) мицеллу, содержащую амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, и
- б) по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что наночастицы, содержащие амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, могут быть получены более легко и с более высокой степенью чистоты.

Без связи с теорией, лежащей в основе эффектов наночастиц по настоящему изобретению, в настоящее время понятно, что при поглощении наночастиц посредством LSEC по меньшей мере один пептид, связанный с наружной частью мицеллы, высвобождается путем либо гидролиза, либо протеолиза, либо другой активности в эндосомах, процессируется, как если бы он был переносимым кровью антигеном, и презентуется Т-клеткам в толерогенной среде. Низкомолекулярный амфифильный полимер позволяет экскрецию индивидуальных полимерных молекул при высвобождении *in vivo*. Это обеспечивает гепатобилиарную экскрецию, которая, по-видимому, является предпочтительным путем экскреции наночастиц.

Неожиданно было обнаружено, что низкомолекулярные амфифильные полимеры, имеющие среднечисловую молекулярную массу (M_n) 20000 г/моль или менее, могут без труда экскретироваться. Также ожидается, что низкомолекулярные амфифильные полимеры и их метаболиты будут быстро выводиться из организма после введения.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что низкомолекулярный амфифильный полимер имеет преимущественные свойства в ходе продуцирования наночастиц по настоящему изобретению. Низкомолекулярный амфифильный полимер образует меньше агрегатов в ходе покрытия твердой сердцевины, чем высокомолекулярный амфифильный полимер. Кроме того, низкомолекулярный амфифильный полимер может быть более эффективно очищен по сравнению с высокомолекулярным амфифильным полимером. В частности, когда в наночастице по изобретению используется низкомолекулярный амфифильный полимер, несвязанный полимер может быть отделен более эффективно.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей наночастицу.

Также настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей наночастицу, для применения для индукции образования регуляторных Т-клеток, специфичных по меньшей мере к одному Т-клеточному эпитопу, у индивидуума для лечения или предупреждения заболевания, при котором является благоприятным подавление специфического иммунного ответа.

Наконец, настоящее изобретение относится к способу получения наночастицы, включающему:

- i) получение амфифильного полимера со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее,
- ii) необязательно очистку амфифильного полимера,
- iii) формирование мицелл из амфифильного полимера,
- iv) добавление по меньшей мере одного пептида с получением наночастиц.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлена блок-схема, демонстрирующая синтез комплекса железо-олеат.

На фиг.2 представлена блок-схема, демонстрирующая синтез суперпарамагнитных наночастиц из оксида железа (SPION).

На фиг.3 представлена блок-схема, демонстрирующая синтез низкомолекулярного полимера малеиновый ангидрид-alt-1-октадецен (LM-PMAOD).

На фиг.4 представлена блок-схема, демонстрирующая синтез низкомолекулярного полимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен (LM-PMAcOD).

На фиг.5 представлена блок-схема, демонстрирующая покрытие SPION полимером.

На фиг.6 представлена блок-схема, демонстрирующая связывание пептидов с наночастицами по настоящему изобретению.

На фиг.7 представлены изображения, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), наночастиц по настоящему изобретению (увеличение 100×).

На фиг.8 представлен график, на котором показано распределение молекулярной

массы LM- PMAcOD при определении с использованием гель-проникающей хроматографии и полистирола в качестве калибровочного стандарта.

На фиг.9-11 проиллюстрированы хроматограммы SEC для очистки образцов NM-PMAcOD-SPION.

На фиг.12 представлены результаты эксклюзионной хроматографии для очистки образцов LM-PMAcOD-SPION.

На фиг.13 представлены хроматограммы SEC для продуктов после нанесения покрытия.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением предусматриваются наночастицы, которые содержат мицеллу, содержащую амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, который придает наночастице растворимость в воде, и по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп. Кроме того, наночастицы могут содержать твердую гидрофобную сердцевину, которая покрыта мицеллами.

В соответствии с настоящей заявкой, термин "наночастица" используется взаимозаменяемо с "наноразмерной частицей". Такие частицы имеют диаметр от 1 до 999 нм, предпочтительно, от 2 до 600 нм, от 5 до 500 нм, от 10 до 300 нм, от 30 до 100 нм или от 40 до 50 нм.

В контексте настоящего изобретения наночастица представляет собой структуру, образованную по меньшей мере мицеллой и пептидом, который связан с мицеллой. Пептиды могут быть либо связаны с наружной частью мицеллы, либо инкапсулированы в мицеллу.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения наночастицы по настоящему изобретению содержат твердую гидрофобную сердцевину, мицеллы, покрывающие сердцевину, содержащие амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, который придает наночастице растворимость в воде, и по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп.

Мицелла

В контексте настоящего изобретения термин "мицелла" относится к агрегату амфифильных молекул, диспергированных в водном растворе. Гидрофильные части амфифильных молекул находятся в контакте с окружающим растворителем, секвестрирующим гидрофобные "хвостовые" участки амфифильных молекул внутри мицеллы, и, таким образом, придают наночастице растворимость в воде. Этот тип мицелл также известен как нормально-фазовая мицелла (или мицелла типа "масло в воде").

Мицелла может быть образована одной, но также более чем одной, например, двумя, тремя или четырьмя амфифильными полимерными молекулами. Мицелла может быть образована одними и теми же или различными амфифильными полимерными молекулами. Как правило, в контексте описания подразумевается, что форма

единственного числа не ограничивается "одним", если это конкретно не указано.

В предпочтительном варианте осуществления мицелла образована одним слоем амфифильного полимера.

Такая мицелла может структурно отличаться от бислоя или липосомы, образованных амфифильным полимером. В этом случае, такие структуры не содержатся, или не содержатся в значительном процентном количестве (например, не более 10%, не более 5% или предпочтительно не более 1%), в наночастице по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения амфифильный полимер используют для получения по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 90% мицеллы. В предпочтительном варианте осуществления мицелла состоит из амфифильного полимера.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения наночастицы не содержат твердую гидрофобную сердцевину. В других вариантах осуществления наночастицы содержат мицеллу и твердую гидрофобную сердцевину.

Способы получения наночастиц по настоящему изобретению подробно описаны ниже.

Амфифильный полимер

Амфифильный полимер по настоящему изобретению, как правило, содержит гидрофобную область, содержащую гидрофобную алифатическую цепь, имеющую длину от 8 до 23, предпочтительно от 8 до 21, наиболее предпочтительно от 16 до 18, атомов углерода.

Гидрофобная область амфифильного полимера может быть отрицательно заряженной в водном растворе.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения амфифильный полимер самопроизвольно образует мицеллы в растворе. Когда присутствует твердая гидрофобная сердцевина, амфифильный полимер образует мицеллы вокруг твердой сердцевины, придавая наночастице растворимость в воде.

Среднечисловая молекулярная масса (M_n) амфифильного полимера составляет 20000 г/моль или менее, предпочтительно 10000 г/моль или менее, или 6000 г/моль или менее, более предпочтительно от 6000 до 1000 г/моль, наиболее предпочтительно от 3000 до 6000 г/моль.

Среднечисловая молекулярная масса может быть определена с использованием гель-проникающей хроматографии (GPC), предпочтительно с использованием полистирола в качестве калибровочного стандарта.

В предпочтительном варианте осуществления среднечисловую молекулярную массу определяют с использованием колонки PL-gel mixed-D при температуре 40°C, с подвижной фазой, состоящей из смеси тетрагидрофуран/уксусная кислота 90/10% (об./об.), при скорости потока 1,0 мл/мин, в комбинации с детектором индекса рефракции при температуре 35°C, и с полистиролом в качестве калибровочного стандарта.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления для определения

среднечисловой молекулярной массы используется GPC и следующие условия измерения:

Эталонные стандарты	Стандарт полистирола (ММ (номинальная M_p); от 1000 г/моль до 130000 г/моль)
Колонка	Agilent PL-gel mixed-D, 300×7,5 мм ID, 5 мкм
Температура колонки	40°C
Детектор	Детектор индекса рефракции при 35°C
Скорость потока	1,0 мл/мин
Объем инжектирования	20 мкл
Температура автоматического пробоотборника	Внешняя
Время прогона	15 мин
Подвижная фаза	Тetraгидрофуран/уксусная кислота [90/10]%(об./об.)
Программа подвижной фазы	Изократическая

Амфифильный полимер может представлять собой чередующийся сополимер. Чередующийся сополимер представляет собой сополимер, содержащий два типа мономерных элементов, распределенных чередующимся образом.

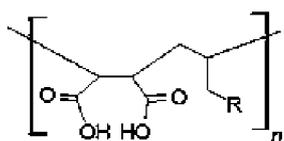
В одном варианте осуществления настоящего изобретения амфифильный полимер представляет собой сополимер малеинового ангидрида и по меньшей мере одного алкена.

Алкен, используемый для получения амфифильного полимера, может быть выбран из одного или нескольких из 1-децена, 1-ундецена, 1-додецена, 1-тридецена, 1-тетрадецена, 1-пентадецена, 1-гексадецена, 1-гептадецена, 1-октадецена, 1-нонадецена или 1-эйкозена, предпочтительно алкен представляет собой 1-октадецен.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения амфифильный полимер представляет собой сополимер малеинового ангидрида и алкена.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения амфифильный полимер имеет основной гидрофильный остов из полимера малеинового ангидрида, имеющий гидрофобные алкильные боковые цепи. Как правило, боковая цепь может иметь от 5 до 23 атомов углерода, в частности, от 9 до 21 атомов. В наиболее предпочтительном варианте осуществления боковые цепи являются линейными и имеют от 10 до 18 атомов углерода.

Амфифильный полимер может содержать следующий структурный элемент



где R представляет собой гидрокарбильную группу или замещенную гидрокарбильную группу. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения R представляет собой C_4 - C_{22} алкильную группу, такую как C_7 - C_{19} алкильная

группа.

В еще более предпочтительном варианте осуществления R представляет собой линейную алкильную группу, предпочтительно линейную C₇-C₁₇ алкильную группу, наиболее предпочтительно R представляет собой линейную пентадецильную группу или линейную нонильную группу.

Амфифильный полимер может состоять из структурного элемента, определенного выше.

В других вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением амфифильный полимер содержит по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 70%, наиболее предпочтительно более 90% структурных элементов, определенных выше.

В предпочтительном варианте осуществления амфифильный полимер выбран из группы включающий полимер малеиновая кислота-1-октадецен, полимер малеиновая кислота-1-тетрадецен или полимер малеиновая кислота-1-додецен, предпочтительно полимер представляет собой полимер малеиновая кислота-1-октадецен и среднечисловая молекулярная масса полимера составляет от 6000 до 1000 г/моль.

В особенно предпочтительном варианте осуществления амфифильный полимер выбран из группы, включающей полимер малеиновая кислота-alt-1-октадецен, полимер малеиновая кислота-alt-1-додецен и полимер малеиновая кислота-alt-1-тетрадецен, предпочтительно полимер представляет собой полимер малеиновая кислота-alt-1-октадецен и среднечисловая молекулярная масса полимера составляет от 5000 до 1000 г/моль.

Способы получения амфифильного полимера по настоящему изобретению также подробно описаны ниже.

Пептиды

Наночастица по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один T-клеточный эпитоп. Пептид может быть связан с наружной частью мицеллы или инкапсулирован внутрь мицеллы (в вариантах осуществления, где в наночастице по настоящему изобретению твердая сердцевина не присутствует). Таким образом, пептид может находиться снаружи мицеллы или внутри мицеллы.

Пептид может быть ковалентно связан с мицеллой или нековалентно связан, предпочтительно ковалентно связан с мицеллой.

В предпочтительном варианте осуществления пептид ковалентно связан с мицеллой с использованием способа ковалентного присоединения, известного в данной области, такого как карбодиимидное или сукцинимидное присоединение. Предпочтительно, пептид ковалентно связан с мицеллами с использованием химии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC).

В контексте настоящего изобретения подразумевается, что термин "пептид" не ограничивается размером, в частности, пептид может включать целый белок или от 8 до

2000 аминокислот, предпочтительно от 8 до 200 аминокислот, от 8 до 100 аминокислот, от 9 до 60 аминокислот или от 10 до 20 аминокислот. Также термин включает комбинации различных пептидов, которые могут быть связаны друг с другом в качестве слитых полипептидов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид содержит от 10 до 20, как например, от 13 до 17 аминокислот.

В особенно предпочтительном варианте осуществления пептид содержит 15 аминокислот.

Пептид содержит по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп. Способы идентификации Т-клеточных эпитопов и отдельных Т-клеточных эпитопов хорошо известны в данной области и описаны, например, в публикациях Rammensee et al., 1999 (*Immunogenetics* 50 213-219) и Sanchez-Trincado et al. 2017 (*J Immunol Res.* 2017:2680160. doi: 10.1155/2017/2680160. Epub 2017 Dec 28). В контексте настоящего изобретения Т-клеточный эпитоп представляет собой пептидную последовательность, индуцирующую регуляторные Т-клетки. По меньшей мере один эпитоп должен быть способен презентироваться клетками индивидуума, которому намереваются вводить наночастицы. Предпочтительно, пептид содержит несколько эпитопов, которые позволяют ему презентироваться множеством типов основного комплекса гистосовместимости.

Поскольку регуляторные Т-клетки преимущественно являются CD4+, основной интерес представляет презентация на МНС класса II. Тип HLA этого индивидуума, например, человека, можно без труда тестировать в качестве части набора эпитопов. Эпитопы конкретного пептида, которые могут презентироваться на конкретных молекулах МНС, известны и/или могут быть стандартным образом выбраны, например, посредством соответствующего программного обеспечения.

Пептиды конструируют на основе опубликованных данных, чтобы убедиться, что они - в ассоциации с конкретным элементом HLA-рестрикции - связывают МНС/HLA с высокой аффинностью и значительно стимулируют и активируют Т-клетки. В идеальном случае, предпочтительные для выбора пептиды устанавливаются, исходя из естественным образом процессуемых пептидов и охарактеризованных как иммунодоминантные.

Пептид может быть синтезирован, рекомбинантно экспрессирован, или выделен или модифицирован из природных источников. Пептид, или по меньшей мере эпитоп, против которого намереваются индуцировать регуляторные Т-клетки, предпочтительно происходит из пептида/белка, против которого намереваются подавлять воспалительный иммунный ответ, например, в контексте лечения или предупреждения аутоиммунного заболевания или аллергии. Пептид может представлять собой, например, аллерген, известный аутоиммунный антиген или его фрагмент или производное. Пептид может сочетать в себе разные эпитопы из разных антигенов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пептид представляет собой антигенный пептид, образованный из десмоглеина-3 (Dsg3). Например, пептид может представлять собой один или более одного из пептидов

десмоглеина-3, соответствующих SEQ ID NO:1-3.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, наночастицы содержат только один тип пептида, содержащего по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп.

В соответствии со следующим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей различные наночастицы, где каждая наночастица содержит многочисленные пептиды, имеющие одинаковую аминокислотную последовательность, но композиция содержит смеси наночастиц, которые отличаются друг от друга пептидной последовательностью. Композиция может содержать, например, различные наночастицы, содержащие от 2 до 6 различных пептидов. В одном аспекте композиция различных наночастиц может содержать три различных типа наночастиц, каждый из которых соответствует одной из SEQ ID NO:1-3.

Твердая гидрофобная сердцевина

В одном варианте осуществления настоящего изобретения наночастица содержит твердую гидрофобную сердцевину, по меньшей мере частично покрытую мицеллами.

Сердцевина может представлять собой неорганическую сердцевину, предпочтительно содержащую оксид железа, CdSe, серебро или золото.

Диаметр сердцевины может составлять от 2 до 500 нм, предпочтительно, от 3 до 25 нм, более предпочтительно, от 5 до 15 нм. Диаметр сердцевины может быть определен с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) или малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS).

Иллюстративными неорганическими сердцевинами являются наночастицы из оксида железа, стабилизированные олеиновой кислотой или другой карбоновой кислотой (C₁₄-C₂₂, предпочтительно, C₁₆-C₁₈), квантовые точки (CdSe/CdS/ZnS, стабилизированные, например, посредством триоктилосинофосфиноксида), золотые наночастицы, например, стабилизированные сульфоновыми соединениями.

Такие неорганические сердцевинки сами по себе, как правило, не являются стабильными в водном растворителе, таком как вода, однако заключение их в полимерные мицеллы придает им растворимость в воде. Гидрофобные части амфифильного полимера взаимодействуют с гидрофобной сердцевиной наночастицы, вызывая образование единого слоя покрытия из полимера, окружающего сердцевину. В процессе нанесения покрытия амфифильный полимер может заменять гидрофобную часть сердцевины путем лигандного обмена, и, таким образом, вокруг сердцевины образуется двухслойная мицелла. В одном варианте осуществления изобретения полимер по меньшей мере частично заменяет олеиновую кислоту на поверхности сердцевины частицы, и гидрофильная часть полимера взаимодействует с поверхностью сердцевины из оксида железа, и гидрофобные части полимера взаимодействуют друг с другом, образуя двухслойную мицеллу вокруг сердцевины из оксида железа, что приводит к оксиду железа, покрытому полимером.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего

изобретения, сердцевина является суперпарамагнитной.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения сердцевина представляет собой суперпарамагнитную наночастицу из оксида железа (SPION), которая может быть стабилизирована олеиновой кислотой.

Сердцевины предпочтительно обеспечивают возможность отслеживания наночастиц по изобретению, например, вследствие их характеристик во флуоресцентном способе, электронной микроскопии или другом способе детекции.

Наночастицы

Авторы изобретения обнаружили, что наночастицы для применения в рамках настоящего изобретения являются пригодными для переноса пептида в синусоидальные эндотелиальные клетки печени индивидуума *in vivo*.

Кроме того, наночастицы могут содержать часть, например, углевод или белок, нацеливающую их или усиливающую нацеливание в конкретные клетки, такие как синусоидальные эндотелиальные клетки печени и/или купферовы клетки. Такая часть может, например, усиливать или ускорять захват из кровотока посредством рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Примерами подходящих модификаций являются углеводы, такие как манноза.

Наночастица вследствие полимера, образующего мицеллу, может быть отрицательно заряженной или незаряженной; предпочтительно, наночастица является отрицательно заряженной при pH от 6 до 7. Полимерное покрытие может содержать кислотные группы, например, карбоновых кислот, обеспечивающие отрицательный заряд наночастицы.

Наночастицы по настоящему изобретению могут иметь зета-потенциал от -20 до -50 мВ, предпочтительно от -25 до -45 мВ, более предпочтительно от -28 до -42 мВ при pH от 6 до 7 (pH в ходе измерения). Зета-потенциал можно измерять с использованием устройства Malvern Zetasizer Nano ZS.

Наночастицы по настоящему изобретению могут иметь гидродинамический диаметр (z-средний) от 10 до 100 нм или от 10 до 70, предпочтительно от 10 до 50, более предпочтительно от 20 до 40 нм, наиболее предпочтительно от 22 до 32 нм при определении посредством динамического рассеяния света (DLS).

Наночастицы по настоящему изобретению могут иметь индекс полидисперсности ниже 0,50, предпочтительно от 0,05 до 0,45, более предпочтительно от 0,10 до 0,40, при определении посредством динамического рассеяния света (DLS).

Определение гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности проводят с использованием способов анализа с использованием электрофоретического рассеяния света, предпочтительно Malvern Zetasizer. В одном варианте осуществления способ определения гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности проводят с использованием электрофоретического рассеяния света, одноразовых полистироловых кювет, Zetasizer Software 7.12, воды milli-Q. Стандарты наносфер размером 20 нм и 100 нм (сертифицированные NIST или эквивалентные) разбавляют в 0,9% водном растворе

хлорида натрия раствор и тестируемые образцы разбавляют водой. Все водные реагенты фильтруют через 0,22-мкм мембрану перед применением. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения способ определения гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности проводят с использованием электрофоретического рассеяния света в комбинации со следующими условиями анализа:

Обзор условий анализа:

Параметр	Условия
Наименование дисперсанта	вода
RI дисперсанта	1,33
Вязкость (сР при 25,0°C)	0,8872
RI материала (образец)	2,42
RI материала (стандарты)	1,333
Поглощение материала	0,05
Температура (°C)	25
Положение измерения (мм)	4,65
Описание ячейки	Одноразовая кювета для определения размера
Аттенуатор	Авто
Длительность измерения	Авто

Оценка данных основана на среднем диаметре (Z-среднее значение, нм по интенсивности), который является параметром, также известным в DLS как среднее значение кумулянтов и индекс полидисперсности (PDI), которые используются в качестве показателя распределения размера.

Более того, наночастицы по настоящему изобретению могут иметь общее содержание полимера от 0,1 до 5 мг/мл, предпочтительно от 0,5 до 4 мг/мл, более предпочтительно от 1 до 3 мг/мл. Общее содержание полимера определяют посредством GPC. Для измерения общего содержания полимера пептиды гидролизуют и частицы разрушают (например, с использованием 6 М раствора HCl). После добавления EDTA полимер экстрагируют. После выпаривания растворителя остаток перерастворяют и определяют содержание полимера посредством GPC.

Определение общего содержания полимера предпочтительно проводят с использованием следующих реагентов и эталонных стандартов воды (категория ВЭЖХ), ацетонитрила (категория ВЭЖХ), тетрагидрофурана с ВНТ (категория THF-ВЭЖХ), 100% уксусной кислоты (аналитическая категория), хлористоводородной кислоты 37% (аналитическая категория), дигидрата динатриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты (аналитическая категория), этилацетата (аналитическая категория), гидроксида натрия (аналитическая категория) и полимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен в

качестве эталонного материала.

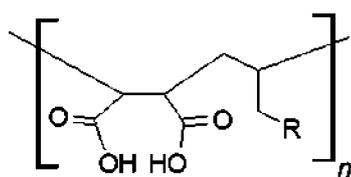
Условия хроматографии для определения общего содержания полимера представляют собой:

Колонка	Agilent PL-gel Mixed-D, 300+75 мм ID, 5 мкм
Температура колонки	40°C
Скорость потока	1,0 мл/мин
Детектор	Детектор индекса рефракции при 35°C
Частота для образца	2,31 Гц или эквивалентная
Объем инжектирования	20 мкл
Температура автоматического пробоотборника	Внешняя
Время прогона	15 мин
Подвижная фаза	ТНФ/уксусная кислота [90/10]% (об./об.)
Программа для подвижной фазы	Изократическая

С особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения наночастицы содержат сердцевину из оксида железа, инкапсулированную в покрытие из полимера малеиновой кислота-alt-1-октадецен, имеющего среднечисловую молекулярную массу от 6000 до 1000 г/моль или менее, и пептид, содержащий по меньшей мере один пептид Т-клеточного эпитопа, который предпочтительно ковалентно связан с мицеллой.

В одном аспекте настоящее изобретение, таким образом, относится к наночастицам, содержащим

а) мицеллу, содержащую амфифильный полимер, содержащий следующий структурный элемент



где R представляет собой гидрокарбильную группу или замещенную гидрокарбильную группу, предпочтительно R представляет собой линейную алкильную группу, предпочтительно линейную C₁₁-C₁₇ алкильную группу и где полимер имеет среднечисловую молекулярную массу (M_n) от 6000 до 1000 г/моль, и

б) по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпипептид; и

с) твердую гидрофобную сердцевину, которая по меньшей мере частично покрыта мицеллой, где сердцевина содержит поддающийся отслеживанию неорганический материал, выбранный из группы, включающей оксид железа, CdSe/CdS/ZnS, серебро и золото.

Среднечисловая молекулярная масса полимера предпочтительно составляет от

6000 до 1000 г/моль.

Наночастица предпочтительно имеет гидродинамический диаметр от 50 до 10 нм при определении посредством динамического рассеяния света.

Фармацевтическая композиция

Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей наночастицы по настоящему изобретению.

Используемые пептиды могут присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации от 0,01 до 2 мМ, предпочтительно от 0,1 до 1 мМ, наиболее предпочтительно от 0,45 мМ до 1 мМ.

В предпочтительном варианте осуществления количество свободного (несвязанного) полимера в композиции составляет менее 10%, предпочтительно менее 5%, наиболее предпочтительно менее 2% от общего количества полимера.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, кроме того, может содержать по меньшей мере один подходящий эксципиент и/или разбавитель. Разбавитель предпочтительно является водным или на водной основе, например, буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (PBS), раствор Рингера, TRIS-буфер или раствор хлорида натрия. Могут присутствовать или могут не присутствовать подходящие консерванты.

Очевидно, что, в частности, для введения человеку композиция предпочтительно является стерильной и биологически совместимой.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит наночастицы по настоящему изобретению, диспергированные в D-манните, TRIS и/или L-молочной кислоте.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит наночастицы по настоящему изобретению, которые не содержат твердую гидрофобную сердцевину, причем наночастицы диспергированы в D-манните, TRIS и/или L-молочной кислоте. Использование этого буфера имеет преимущество, состоящее в том, что частицы являются в высокой степени стабильными в этом буфере и могут быть позднее лиофилизированы.

Более того, фармацевтическая композиция может содержать более одного типа наночастиц по настоящему изобретению, где различные типы наночастиц имеют различные пептиды, связанные с наружной частью мицеллы. С использованием смеси наночастиц может быть индуцирована более широкая иммунная толерантность посредством нескольких аутоантигенных пептидов одновременно. Эти пептиды могут происходить из одного иммуногенного белка или из различных белков.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит от 2 до 6 различных типов наночастиц, где предпочтительно все связанные пептиды различных типов наночастиц содержат по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит от 3 до 4 различных типов наночастиц, где все

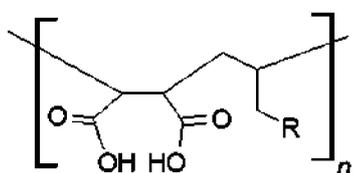
связанные пептиды различных типов наночастиц содержат по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп. В частности, каждая наночастица может быть ассоциирована с отличающимся антигенным пептидом, происходящим из Dsg3.

Фармацевтическая композиция может содержать наночастицы в концентрации ниже 100 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 80 мкМ, наиболее предпочтительно от 1 до 50 мкМ. Если в фармацевтической композиции присутствует более одного типа наночастиц, каждый из них может присутствовать в концентрации ниже 100 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 80 мкМ, более предпочтительно от 1 до 50 мкМ.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать различные типы наночастиц в эквимольной концентрации.

В одном аспекте настоящее изобретение, таким образом, относится к фармацевтической композиции, содержащей наночастицы, содержащие

а) мицеллу, содержащую амфифильный полимер, содержащий следующий структурный элемент



где R представляет собой гидрокарбильную группу или замещенную гидрокарбильную группу, предпочтительно R представляет собой линейную алкильную группу, предпочтительно линейную C₁₁-C₁₇ алкильную группу и где полимер имеет среднечисловую молекулярную массу (M_n) от 6000 до 1000 г/моль, и

б) по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп; и

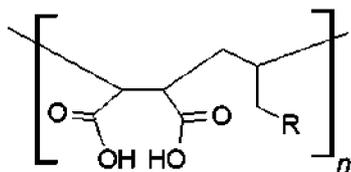
с) твердую гидрофобную сердцевину, которая по меньшей мере частично покрыта мицеллами, где сердцевина содержит поддающийся отслеживанию неорганический материал, выбранный из группы, включающей оксид железа, CdSe/CdS/ZnS, серебро и золото.

Среднечисловая молекулярная масса полимера в фармацевтической композиции предпочтительно находится в диапазоне от 6000 до 1000 г/моль.

Наночастицы в фармацевтической композиции по настоящему изобретению предпочтительно имеют гидродинамический диаметр от 50 до 10 нм при определении посредством динамического рассеяния света.

В предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере три различных типа наночастиц, где каждая наночастица содержит

а) мицеллу, содержащую амфифильный полимер, содержащий следующий структурный элемент



где R представляет собой гидрокарбильную группу или замещенную гидрокарбильную группу, предпочтительно R представляет собой линейную алкильную группу, предпочтительно линейную C₁₁-C₁₇ алкильную группу, и где полимер имеет среднечисловую молекулярную массу (Mn) от 6000 до 1000 г/моль, и

b) по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп; и

c) твердую гидрофобную сердцевину, которая по меньшей мере частично покрыта мицеллой, где сердцевина содержит поддающийся отслеживанию неорганический материал, выбранный из группы, включающей оксид железа, CdSe/CdS/ZnS, серебро и золото; и

где три различных типа наночастиц отличаются друг от друга в пептидной последовательности, где первый тип наночастиц содержит пептиды, имеющие SEQ ID NO:1, второй тип наночастиц содержит пептиды, имеющие SEQ ID NO:2, и третий тип наночастиц содержит пептиды, имеющие SEQ ID NO:3.

Медицинское применение

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предназначена для применения и составлена для введения индивидууму, имеющему заболевание, при котором подавление специфического иммунного ответа является благоприятным.

Фармацевтические композиции можно вводить индивидууму, нуждающемуся в этом.

Требуемая доза и концентрация для введения индивидууму может быть определена ответственным медицинским специалистом в зависимости от фактов и обстоятельств данного случая. Иллюстративная доза может содержать от 0,03 мкмоль до 0,90 мкмоль на массу тела пациента, например, для человека.

Введение можно повторять, например, два раза, три раза или четыре раза, например, с интервалом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 суток между введениями.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция предназначена для применения для подавления специфического иммунного ответа, такого как лечение или предупреждение заболевания, где подавление специфического иммунного ответа является благоприятным. Более предпочтительно, фармацевтическая композиция предназначена для применения для индукции образования регуляторных Т-клеток, специфичных по меньшей мере к одному Т-клеточному эпитопу, у индивидуума для лечения или предупреждения заболевания, где подавление специфического иммунного ответа является благоприятным.

Заболевание может представлять собой аутоиммунное заболевание,

ассоциированное с определенными аутоантигенами. В контексте настоящего изобретения термин "аутоиммунное заболевание" понимают, как определено Hayter et. al. (Autoimmunity Reviews 11 (2012) 754-765). В предпочтительном варианте осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей пемфигус обыкновенный, пемфигус листовидный, приобретенный буллезный эпидермолиз, буллезный пемфигоид, рубцовый пемфигоид, синдром Гудпасчера, микроскопический полиангиит, гранулематоз с полиангиитом (гранулематоз Вегенера), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру, увеит, HLA-B27-ассоциированный острый передний увеит, рассеянный склероз, оптический нейромиелит, диабет типа I, нарколепсию с катаlepsией или без нее, целиакию, герпетиформный дерматит, аллергическое заболевание дыхательных путей/астму, миастению, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грэйвса, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунный гипопаратиреоз, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Гийена-Барре, аутоиммунную нейтропению, линейную склеродермию, болезнь Баттена, приобретенную гемофилию А, рецидивирующий полихондрит, синдром Айзека (приобретенная нейромиотония), энцефалит Расмуссена, синдром Морвана, синдром мышечной скованности, пернициозную анемию, синдром Фогта-Коянаги-Харада, первичный билиарный цирроз, аутоиммунный гепатит типа I, аутоиммунный гепатит типа II, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, полимиозит/дерматомиозит, синдром Шегрена, склеродермию, витилиго и очаговую алопецию.

Более предпочтительно, аутоиммунное заболевание выбрано из группы, включающей пемфигус обыкновенный, синдром Гудпасчера, микроскопический полиангиит, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, оптический нейромиелит, диабет типа I, нарколепсию с катаlepsией или без нее, целиакию, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию и приобретенную гемофилию А.

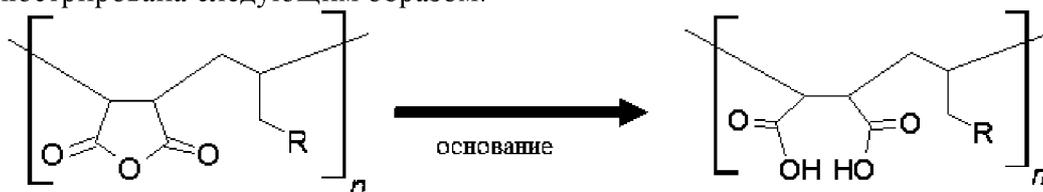
В соответствии с настоящим изобретением, термин "лечение" используют для указания на облегчение симптомов конкретного заболевания у индивидуума и/или улучшение поддающегося определению показателя, ассоциированного с конкретным нарушением.

Способ получения амфифильного полимера и наночастиц

Способы получения амфифильного полимера и наночастиц, содержащих его, проиллюстрированы в примерах 1-4.

Один из способов получения амфифильного полимера со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее состоит в его синтезе с использованием двухстадийного способа, включающего стадию получения полимера ангидрида и стадию гидролиза ангидрида с получением кислоты. Стадия гидролиза

ангидридной формы полимера для получения кислотной формы может быть проиллюстрирована следующим образом:



Настоящее изобретение также относится к способу получения наночастицы, включающему:

- i) получение амфифильного полимера со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее,
- ii) необязательно очистку амфифильного полимера,
- iii) формирование мицелл амфифильного полимера, и
- iv) добавление по меньшей мере одного пептида с получением наночастиц.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых пептиды инкапсулированы в мицеллу, стадию iv) проводят до стадии iii). В этих вариантах осуществления пептиды добавляют к амфифильному полимеру до формирования мицелл.

Амфифильный полимер, используемый в наночастицах по настоящему изобретению, может быть получен (стадия i) посредством радикальной сополимеризации с использованием радикального инициатора.

Молекулярную массу полимера можно контролировать путем варьирования концентраций реагентов или количества радикального инициатора. Молекулярную массу полимера можно анализировать посредством гель-проникающей хроматографии.

Сополимеризацию можно проводить в органическом растворителе, таком как 1,4-диоксан, ксилол или хлорбензол.

В данной области известно множество радикальных инициаторов; они включают различные пероксиды и соединения азо-типа. Примерами подходящих пероксидов являются бензоилпероксид, лаурилпероксид, ди-*t*-бутилпероксид, 2,4-дихлорбензилпероксид, *t*-бутил-гидропероксид, гидропероксид кумола, диацетилпероксид, диэтилпероксикарбонат, *t*-бутилпербензоат и пербораты. Подходящие соединения азо-типа включают 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил), фторборат *p*-бромбензолдиазония, *p*-толилдиазоаминобензол, гидроксид *p*-бромбензолдиазония, азометан и галогениды фенилдиазония. Предпочтительно, радикальный инициатор представляет собой 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил).

Сополимеризацию можно проводить при повышенных температурах, таких как от 70 до 120°C, предпочтительно от 90 до 110°C.

Предпочтительно, сополимеризацию инициируют нагреванием смеси до 70-120°C, предпочтительно 90-110°C.

В предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению стадия i) включает стадии смешения реагентов, дезоксигенации смеси, нагревания смеси, а затем охлаждения смеси. После этого полимер можно растворять и перемешивать в

течение ночи. Образовавшееся твердое вещество можно выделять, предпочтительно с использованием центрифугирования.

В предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению стадия ii) включает добавление основания к полимеру (например, NaOH). Предпочтительно основание подвергают реакции с полимером при повышенной температуре, предпочтительно от 50°C до 70°C, такой как 60°C, пока практически все твердые вещества не растворятся. Полученную суспензию можно подкислять (например, pH < 2). После этого реакционную смесь можно экстрагировать органическим растворителем, таким как этилацетат. Органический слой может быть экстрагирован раствором гидроксида натрия. Водный раствор можно вновь экстрагировать органическим растворителем, таким как этилацетат, а затем сушить с получением очищенного амфифильного полимера.

Полимер может быть дополнительно очищен (стадия iii). Предпочтительно, полимер дополнительно очищают путем экстракции полимера n-гексаном или n-гептаном. Экстракцию можно проводить в концентрациях выше 10 г/л, предпочтительно 100 г/л.

Более того, между стадиями i) и ii) может быть добавлена дополнительная стадия очистки амфифильного полимера. На этой дополнительной стадии очистки неочищенный продукт реакции полимеризации растворяют и преципитируют. В предпочтительном варианте осуществления растворитель представляет собой дихлорметан и полимер преципитируют с использованием смеси метанол/гептан или ацетонитрил/изопропанол. Используемые смеси могут содержать, например, 95/5% (об./об.%) метанола/гептана, 10/90 (об./об.%) ацетонитрила/изопропанола или 5/95 (об./об.%) ацетонитрила/изопропанола. В предпочтительном варианте осуществления смесь для преципитации добавляют при температурах от -10 до 10°C, предпочтительно от -5 до 5°C.

Чистоту амфифильного полимера после гидролиза и обработки можно определять посредством ¹H-ЯМР.

В способе по настоящему изобретению мицеллу формируют путем получения раствора, содержащего амфифильный полимер. Предпочтительно, мицеллу формируют в водном растворе. К амфифильному полимеру можно добавлять стабилизаторы для повышения образования мицелл.

Пептиды для применения на стадии iv) можно синтезировать с использованием современной твердофазной химии.

Пептиды могут быть ковалентно связаны с мицеллой или нековалентно ассоциированы.

В предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению пептиды связывают с поверхностью наночастицы с использованием способов присоединения пептидов, известных в данной области, например, карбодиимидного или сукцинимидного присоединения.

В особенно предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему

изобретению пептиды связывают с поверхностью наночастицы посредством химии EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) в водной фазе.

Полученные наночастицы можно очищать с использованием стадий тщательного промывания и фильтрации для удаления присоединяющего реагента(ов) и любых низкомолекулярных компонентов.

В предпочтительном варианте осуществления способ получения наночастицы включает:

- a) получение наночастицы гидрофобной сердцевины,
- b) получение амфифильного полимера со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, предпочтительно с использованием радикальной сополимеризации,
- c) необязательно очистку амфифильного полимера,
- d) смешение наночастиц гидрофобной сердцевины и амфифильного полимера с получением мицелл,
- e) добавление по меньшей мере одного пептида с получением наночастиц.

Обсуждение стадий i)-iii) и iv), выше, также применимо к стадиям b)-d) и e), соответственно.

Гидрофобную сердцевину стадии a) можно синтезировать с использованием соответствующих реагентов в растворе. В предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению гидрофобную сердцевину можно синтезировать с использованием солей металлов и солей карбоновых кислот в качестве реагентов в присутствии органических растворителей. Предпочтительно, реакцию проводят при повышенных температурах в условиях ограничения кислорода.

Мицелла может быть получена путем размещения амфифильного сополимера вокруг сердцевины на стадии e). Предпочтительно стадия d) включает подстадии солюбилизации амфифильного полимера и частиц сердцевины, удаления растворения до тех пор, пока не образуется тонкая пленка, добавления основного водного раствора при повышенной температуре и внешнем давлении с получением водной коллоидной дисперсии, разбавления раствора и необязательно фильтрации его. После этого можно проводить несколько стадий промывания.

Примеры

Изобретение иллюстрируется следующими примерами, которые подробно описывают синтез наночастиц в соответствии с настоящим изобретением.

Эти примеры должны считаться не ограничивающими объем изобретения, а иллюстрирующими его.

Пример 1: Получение кристаллических сердцевин из суперпарамагнитного оксида железа (SPION)

Синтез комплекса железо-олеат схематично представлен на фиг. 1.

На первой стадии комплекс железо-олеат синтезировали путем смешения олеиновой кислоты, гидроксида натрия и хлорида железа при кипячении с обратном

холодильником при 70°C. Продукт очищали посредством нескольких стадий промывания в делительной воронке, а затем сушили сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе. Это приводило к кристаллическим сердцевинам из оксида железа (фиг.1).

На второй стадии (фиг.2), комплекс железо-олеат растворяли в 1-октадецене при комнатной температуре и перемешивали до полного растворения. Затем добавляли олеиновую кислоту, дезоксигинировали и нагревали в течение 3 часов при 300°C для образования нанокристаллов оксида железа.

После охлаждения продукт очищали посредством нескольких стадий промывания с использованием магнитного разделения и ацетона/тетрагидрофурана (THF). Очищенные SPION разбавляли хлороформом и концентрировали на роторном испарителе с получением SPION с узким распределением размера и хорошей кристаллическостью.

Пример 2: Получение низкомолекулярного полимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен (LM-PMACOD)

Синтез низкомолекулярного полимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен (LM-PMACOD) осуществляли в двухстадийном процессе, который схематично представлен на фиг.3 и 4.

На первой стадии малеиновый ангидрид (48,9 ммоль) и 1-октадецен (48,2 ммоль) растворяли в 10 мл 1,4-диоксана (ингибитор 1,4-диоксана предварительно удаляли фильтрацией его через 3 г оксида алюминия). После этого добавляли 5,79 ммоль AIBN (2,2'-азобис(2-метилпропионитрил)). Колбу оборудовали холодильником, а затем продували азотом и поддерживали при избыточном давлении азота. Смесь нагревали до 100°C при перемешивании. Через 1 час после начала нагревания нагревательную плиту убрали вместе с пробками; подвергая реакционную смесь воздействию воздуха. Смесь охлаждали до комнатной температуры в течение двух суток при перемешивании. Продукт очищали путем совместного упаривания с дихлорметаном и преципитировали с изопропанолом и ацетонитрилом. Получали низкомолекулярный полимер малеиновый ангидрид-alt-1-октадецен (LM-PMAOD) со среднечисловой молекулярной массой (M_n) от 2500 до 4000 г/моль.

На второй стадии LM-PMAOD гидролизовали до полимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен (LM-PMACOD) в растворе гидроксида натрия. Проводили экстракцию кислотой-основанием с H_2SO_4 , этилацетатом и NaOH для очистки продукта и для удаления примесей, таких как остаточный 1-октадецен. Продукт сушили над сульфатом магния, совместно упаривали с хлороформом и, наконец, очищали посредством экстракции твердого вещества жидкостью в н-гептане (фиг.4).

Среднечисловую молярную массу (M_n) и средневесовую молярную массу (M_w) полученного полимера определяли с использованием гель-проникающей хроматографии.

Образец LM-PMACOD массой 1,5 мг растворяли в 1,0 мл THF (без стабилизатора) и подвергали GPC. В качестве калибровочного стандарта использовали полистирол. В качестве элюента использовали тетрагидрофуран, и скорость потока составляла 1 мл/мин. Температура была установлена на 30°C.

Среднечисловая молярная масса (M_n) полученного LM- PMAcOD составляла 1540 г/мол и средневесовая молярная масса (M_w) составляла 2410 г/моль. Таким образом, была вычислена величина PDI 1,56 для образца, которая является характерной для полимера, полученного посредством неконтролируемой свободнорадикальной полимеризации (см. фиг.8).

Пример 3: Покрытие полимером SPION

Покрытие полимером SPION схематично представлено на фиг.5.

Пример 3а: 100 мг LM- PMAcOD, полученного согласно примеру 2, растворяли в 4 мл хлороформа в 100-мл круглодонной колбе. Смесь нагревали до тех пор, пока полимер не растворялся полностью. 3,3 мл раствора олеат-SPION, полученного согласно примеру 1, добавляли к смеси, а затем упаривали при <10 мбар в течение 15 минут при 40°C на роторном вакуумном испарителе при 280 об/мин. Затем к смеси добавляли 10 мл 5 мМ NaOH и перемешивали на роторном вакуумном испарителе в течение 15 минут при 50°C до тех пор, пока не растворялись все твердые вещества. Раствор разбавляли 8 раз с использованием 70 мл 25 мМ NaOH для растворения всего полимера. Полученный раствор перемешивали на роторном вакуумном испарителе в течение 15 минут с получением коричневого раствора.

Продукт фильтровали через 0,45-мкм и 0,2-мкм фильтр из PES. После этого образец очищали проточной фильтрацией вдоль потока (TFF).

Пример 3б: Ту же методику выполняли с коммерчески доступным полимером размером 30-50 кДа (#419117 Merck) после гидролиза согласно примеру 2. Поскольку удаление несвязанного полимера из покрытых полимером SPION посредством TFF было недостаточным, проводили дополнительное магнитное разделение с использованием колонки Miltenyi для очистки партии PMAcOD-SPION MX0194.

Пример 4: Пептиды и присоединение пептидов

Присоединение пептидов и синтез наночастиц схематично представлены на фиг.6.

Синтез пептидов проводили посредством химии Fmoc в направлении от C к N с использованием твердофазного пептидного синтеза (SPPS). Альфа-аминогруппу каждой аминокислоты защищали группой флуорен-9-илметоксикарбонила (Fmoc), в то время как функциональные группы боковых цепей также блокировали различными соответствующими защитными группами.

Как правило, SPPS состоит из повторяющихся циклов N-концевого удаления защитной группы с последующими реакциями присоединения. Первую Fmoc-защищенную аминокислоту присоединяли к смоле. После этого проводили удаление защитной группы амина с использованием смеси пиперидина в диметилформамиде (DMF), а затем проводили присоединение по свободной кислотной группе второй Fmoc-защищенной аминокислоты. Цикл повторяли до тех пор, пока не получали желаемую последовательность. Смолу промывали между всеми стадиями. Мониторинг завершения каждой реакции присоединения проводили посредством качественного теста с нингидрином. На последней стадии синтеза неочищенную пептид-смолу последовательно

промывали DMF и метанолом, и сушили. Затем защитные группы удаляли из пептида и пептид отщепляли от смолы с использованием трифторуксусной кислоты (TFA). Полученный неочищенный пептид выделяли посредством преципитации простым эфиром из смеси для расщепления.

Кроме того, пептид очищали посредством препаративной ВЭЖХ для достижения требований чистоты, и противоион TFA заменяли хлоридом с использованием соответствующей системы растворитель-буфер. Наконец, очищенный пептид лиофилизировали.

Используемые пептиды имеют аминокислоту на N-конце и свободную кислоту (соль HCl) на C-конце, и имеют длину 15 аминокислот.

Охарактеризацию свободных пептидов (исходные материалы) проводили посредством LC-MS.

Последовательности пептидов и вычисленные моноизотопные массы, использованные в примерах настоящей заявки, представлены в таблице 1.

Таблица 1: Последовательности пептидов и моноизотопная масса

SEQ ID NO:	Последовательность	Молекулярная формула	Моноизотопная масса (теоретическая) (Да)
1	LNSKIAFKIVSQEPA	C ₇₅ H ₁₂₅ N ₁₉ O ₂₂	1643,9
2	TPMFLSRNTGEVRT	C ₇₄ H ₁₂₄ N ₂₂ O ₂₃ S	1720,9
3	REGIAFRPASKTFTV	C ₇₆ H ₁₂₂ N ₂₂ O ₂₁	1678,9

Молекулярную массу пептидов измеряли посредством многорежимной электрораспылительной масс-спектрометрии с химической ионизацией при атмосферном давлении.

Пептиды присоединяли к поверхности мицеллы, полученной согласно примеру 3а, с использованием химии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) в буфере борная кислота/декагидрат тетрабората натрия (SBB).

К мицеллам, полученным согласно примеру 3, добавляли EDC в буфере SBB. После 15 минут при к.т. добавляли пептиды и реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов и 15 минут при к.т.

Полученный раствор наночастиц фильтровали и очищали посредством очистки с использованием проточной фильтрации вдоль потока (TFF).

Пример 5: Охарактеризация наночастиц

Наночастицы, полученные согласно примеру 4, далее охарактеризовывали с использованием различных способов анализа.

Охарактеризацию сердцевины из оксида железа проводили с использованием TEM и SAXS. Измерение с использованием TEM проводили для наночастиц, диспергированных в 5% (масс./об.) D-манните, 5 mM TRIS и 6 mM L-молочной кислоте.

Вычисленные результаты размера частиц на основе анализа с использованием TEM для наночастиц, полученных согласно примеру 4, обобщенно представлены в таблице 2.

Репрезентативные изображения ТЕМ представлены на фиг.7.

Таблица 2: Результаты среднего размера сердцевин из оксида железа на основе анализа с использованием ТЕМ

TPC	Средний размер сердцевин из оксида железа (нм)	Стандартное отклонение (%)
TPC0002 SEQ ID NO:1	9,74	1,04
TPC0003 SEQ ID NO:2	9,45	0,92
TPC0005 SEQ ID NO:3	9,80	0,96

Измерение SAXS проводили на наночастицах, диспергированных в 5% (масс./об.) D-манните, 5 мМ TRIS и 6 мМ L-молочной кислоте.

Вычисленные результаты размера частиц на основе анализа с использованием SAXS для наночастиц, полученных согласно примеру 4, обобщенно представлены в таблице 3.

Таблица 3: Результаты среднего размера сердцевин из оксида железа на основе анализа SAXS

TPC SEQ ID NO:	Средний размер сердцевин из оксида железа (нм)	Стандартное отклонение (%)
TPC0002 SEQ ID NO:1	9,8	1,1
TPC0003 SEQ ID NO:2	10,0	1,1
TPC0005 SEQ ID NO:3	9,8	1,1

Охарактеризацию размера и распределения частиц проводили посредством динамического рассеяния света (DLS). Гидродинамический диаметр (z-среднее значение) и индекс полидисперсности определяли с использованием Malvern Zetasizer Nano ZS или эквивалента в одномодальном режиме.

Эти измерения проводили на наночастицах, полученных согласно примеру 4, диспергированных в 5% (масс./об.) D-манните, 5 мМ TRIS и 6 мМ L-молочной кислоте.

Результаты обобщенно представлены в таблице 4. Из этих результатов можно наблюдать, что состав стабилизирует частицы и может снижать процент крупных частиц.

Таблица 4: Результаты распределения размера на основе анализа DLS

TPC SEQ ID NO:	z-среднее значение	D ₁₀ (нм)	D ₅₀ (нм)	D ₉₀ (нм)	Индекс полидисперс-
-------------------	--------------------	----------------------	----------------------	----------------------	---------------------

	(нм)				ности (%)
TPC0002 SEQ ID NO:1	23	15,8	24,0	37,6	0,13
TPC0003 SEQ ID NO:2	25	16,8	25,1	39,3	0,17
TPC0005 SEQ ID NO:3	26	16,4	24,9	53,9	0,25

Поверхностный заряд частиц анализировали путем измерения зета-потенциала при pH 6-7 (pH в ходе измерения) с использованием устройства Malvern Zetasizer Nano ZS. Эти измерения проводили для наночастиц, полученных согласно примеру 4, диспергированных в 5% (масс./об.) D-манните, 5 мМ TRIS и 6 мМ L-молочной кислоте.

Результаты обобщенно представлены в таблице 4.

Таблица 4: результаты зета-потенциала

TPC SEQ ID NO:	Зета-потенциал (мВ)	Зета-отклонение (мВ)	Проводимость (мС/см)	Итоговое качество
TPC0002 SEQ ID NO:1	-39,5	5,38	1,30	Хорошее
TPC0003 SEQ ID NO:2	-39,1	5,95	1,44	Хорошее
TPC0005 SEQ ID NO:3	-30,1	4,63	1,42	Хорошее

Общее содержание полимера определяли с использованием GPC. Пептиды гидролизовали и частицы разрушали в 6 М HCl. PMAcOD экстрагировали этилацетатом после добавления EDTA. После выпаривания растворителя остаток перерастворяли в смеси THF/уксусная кислота перед анализом.

Результаты обобщенно представлены в таблице 5.

Таблица 5: Общее содержание полимера

TPC SEQ ID NO:	Общее содержание полимера (мг/мл)
TPC0002 SEQ ID NO:1	1,62
TPC0003 SEQ ID NO:2	1,42
TPC0005 SEQ ID NO:3	1,36

Спектроскопические свойства наночастиц определяли посредством инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR).

Распределение основных полос поглощения обобщенно представлено в таблице 6.

Таблица 6: предполагаемое описание ИК-вибрационных режимов для наночастиц

Частота полос поглощения (см ⁻¹)	Описание ИК-вибрационных режимов
3500-3000	Широкий участок О-Н карбоновой кислоты
2920-2919, 2851-2850	Участок С-Н алкана
1646-1642	Участок С=О, слабо сопряженный с участком С-Н и участком N-H
1534-1544	Участок С-N, сильно сопряженный с изгибом N-H
1402-1395	Изгиб О-Н карбоновой кислоты
574-569	Связь Fe-O

Пример 6: Эффект разных размеров амфифильного полимера

Проводили исследование эффекта разных размеров амфифильного полимера в наночастицах по настоящему изобретению. SPION покрывали полимерами PMAcOD со среднечисловой молекулярной массой 3100, 4800 и 5900 г/моль.

Эти полимеры синтезировали, очищали и охарактеризовывали, после чего их использовали в реакции нанесения покрытия на олеат-SPION. После покрытия избыток полимера удаляли с использованием очистки TFF.

а) Синтез полимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен (PMAcOD) с разной молекулярной массой

Проводили синтез трех различных длин сополимера малеиновая кислота-alt-1-октадецен посредством свободнорадикальной полимеризации малеинового ангидрида и 1-октадецена. Эту реакцию проводили в 1,4-диоксане с использованием 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) в качестве инициатора. Инициацию полимеризации проводили путем нагревания смеси до 100°C. Затем после очистки полимер гидролизовали с использованием раствора гидроксида натрия с получением PMAcOD.

Полимеры с более высокой молекулярной массой синтезировали путем проведения полимеризации в условиях более высокой концентрации и/или осуществления полимеризации с меньшим количеством инициатора.

Количество реагентов, используемых для синтеза этих трех полимеров, обобщенно представлено в таблице 7.

Таблица 7: Количество реагентов

	Длина (г/моль)	Малеиновый ангидрид (г)	1-октадецен (г)	AIBN (г)	1,4-диоксан (мл)
PMAcOD3100	3100	4,8	12,36	1,004	40,8

РМАсOD480 0	4800	4,8	12,18	0,950	10,0
РМАсOD590 0	5900	4,8	12,18	0,500	10,0

Чистоту полимера после гидролиза малеинового ангидрида и обработки определяли посредством ^1H -ЯМР (400 Гц, образец 30 мг, стандарт 10 мг бензойной кислоты, 700 мкл D-хлороформа) и длину полимера анализировали посредством гель-проникающей хроматографии (Agilent PL-gel mixed-D, 300 × 7,5 мм ID, 5 мкм, 2 мг/мл в THF/уксусной кислоте (90/10), прогон 15 мин).

в) Эффект разной длины амфифильного полимера

РМАсOD разной длины использовали для покрытия олеат-SPION.

Сначала проводили нанесение покрытия с использованием одинакового соотношения масс полимера и SPION. Для поиска наилучших условий нанесения покрытия молярное соотношение полимера и SPION поддерживали постоянным. Проводили сравнение количеств агрегатов. Способ с наименьшим количеством агрегатов повторяли, а затем проводили очистку с использованием TFF. В ходе TFF проводили мониторинг устранения полимера и количества агрегатов с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC).

Олеат-SPION покрывали РМАсOD3100, РМАсOD4800 и РМАсOD5900 для определения оптимального соотношения полимер/SPION.

Для покрытия олеат-SPION полимер и наночастицы растворяли в хлороформе. Затем хлороформ выпаривали. На последней стадии процедуры нанесения покрытия в колбу добавляли водный раствор гидроксида натрия и перемешивали при 50°C. Для РМАсOD3100 использовали 100 мг полимера. Для покрытий РМАсOD4800 сравнивали 100 мг полимера и 145 мг полимера. Для покрытий РМАсOD5900 сравнивали 100 мг полимера и 177 мг полимера. Таким образом, равные количества мономера сравнивали с равными количествами полимерных цепей относительно РМАсOD3100.

С использованием эксклюзионной хроматографии было определено, какое условие приводило к наименьшему количеству агрегатов.

Результаты обобщенно представлены в таблице 8.

Таблица 8: Обзор агрегатов, полученных путем покрытия SPION разными полимерами

	Длина (г/моль)	Количество полимера (мг)	Количество эквивалентов полимера сравнению РМАсOD3100 по с	Агрегаты (%)
РМАсOD3100	3100	100	1	5,9

PMAcOD4800	4800	100	0,65	5,2
		145	0,93	5,9
PMAcOD5900	5900	100	0,53	16,0
		177	0,93	7,8

с) Эффект разных длин полимеров после очистки

Олеат-SPION покрывали с использованием того же протокола, который использовался ранее. Для всех полимеров использовали одинаковое количество полимерных цепей. После нанесения покрытия PMAcOD-SPION очищали посредством TFF. Вследствие сложности удаления последних количеств полимера PMAcOD5900, было решено также попробовать это покрытие с 0,15 г полимера (0,79 эквивалента по сравнению со стандартным экспериментом с PMAcOD3100).

С использованием SEC было определено, сколько агрегатов и сколько полимера осталось в образце. После нанесения покрытия PMAcOD3100 содержал 5,9% агрегатов, PMAcOD4800 содержал 6,2% агрегатов и PMAcOD5900 содержал 10,7% агрегатов. Это соответствовало данным, описанным в предыдущем разделе.

Затем PMAcOD-SPION очищали посредством TFF. Частицы наносили на мембрану, после чего их ополаскивали 5 мМ NaOH/45 мМ NaCl. Каждые 10 DV (для PMAcOD3100) или 20 DV (для PMAcO4800 и PMAcOD5900) (DV=объем диафильтрации при очистке TFF) образец отбирали и определяли посредством SEC (после). При очистке посредством TFF также проводили взятие образцов в ходе процесса для отслеживания уменьшения количества полимера и увеличения количества агрегатов.

Результаты обобщенно представлены в таблице 9.

Таблица 9: Обзор экспериментов с TFF

Прогон		Количество полимера (мг)	Количество агрегатов в начале (%)	Количество агрегатов после TFF (%)	Использованные DV
1	PMAcOD3100	100	5,9	7,0	160
2	PMAcOD4800	100	6,2	7,3	160
3	PMAcOD5900	177	10,7	10,7	150
4	0	150	10,9	10,4	110

Продукты TFF прогонов 1, 2 и 4 фильтровали через 0,2-мкм фильтр. Продукт прогона 1 также фильтровали через 0,1-мкм фильтр для уменьшения количества агрегатов.

До и после фильтрации образцов проводили измерение динамического рассеяния света (DLS) для определения Z-среднего диаметра и индекса полидисперсности (PDI). Все

партии покрытых PMAcOD SPION продемонстрировали Z-средний диаметр от 26 до 28 нм с PDI от 0,25 до 0,33 (см. таблицу 11).

С использованием атомной абсорбционной спектроскопии (AAS) было определено, что количества железа составляют от 38 до 50 мг после фильтрации, что соответствует выходу железа от 83 до 110%.

Результаты обобщенно представлены в таблице 10.

Таблица 10: Данные DLS; до и после фильтрования.

Прогон	Продукт	Нефильтрованный		Фильтрованный			
		Z-среднее значение (нм)	PDI	Z-среднее значение (нм)	PDI	Содержание железа (мг)	Выход железа (%)
1	PMAcOD3 100 - SPIONS	31,7	0,382	26,8	0,256	38	83
2	PMAcOD4 800 - SPIONS	28,8	0,360	27,0	0,325	50	110
3	PMAcOD5 900 - SPIONS	32,1	0,367	27,6	0,251	46	101

Пример 7: Сравнение очистки PMAcOD-SPION с полимерами, имеющими разную молекулярную массу

SPION, покрытые коммерческим высокомолекулярным PMAcOD (M_n от 30000 до 50000 г/моль) и низкомолекулярным PMAcOD (M_n от 3000 до 5000 г/моль) получали, как описано в примерах 1-4. После этого для удаления несвязанного материала использовали проточную фильтрацию вдоль потока (TFF). TFF представляет собой предпочтительный для выбора способ очистки покрытых SPION, поскольку он может быть без труда масштабирован. Проводили анализ с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC) образцов ретентата и пермеата для мониторинга процесса очистки TFF. Проводили сравнение эффективности очистки с использованием TFF SPION, покрытых высокомолекулярными и низкомолекулярными полимерами.

а) Очистка высокомолекулярных PMAcOD-SPION

На первой стадии образец неочищенных HM-PMAcOD-SPION анализировали с использованием SEC перед очисткой посредством TFF (неочищенный образец, см. фиг.9). Партия неочищенных HM-PMAcOD-SPION продемонстрировала небольшое плечо слева от главного пика HM-PMAcOD-SPION (RT: 15,541), указывая на то, что эта партия содержала минимальное количество крупных агрегатов, причем 21,2% (а/а) несвязанного полимера были свободными (RT: 16,698) в дисперсии.

Затем образец высокомолекулярных PMAcOD-SPION фильтровали посредством TFF с использованием мембраны TFF 300 кДа для отделения НМ-PMAcOD-SPION после покрытия полимера от несвязанных молекул полимера. Как проиллюстрировано на фиг.9 и 10, не достигали разделения, однако как НМ-PMAcOD-SPION, так и полимер НМ-PMAcOD, содержались в пермеате после фильтрации.

Таким образом, тестировали несколько возможностей, чтобы увидеть, можно ли это уменьшить. Однако ни одна не оказалась успешной. Удержание НМ-PMAcOD-SPION было слишком низким для достижения хорошего разделения SPION и полимера без потери слишком большого количества продукта. Мембрана с уменьшенным размером пор 100 кДа обеспечивала удержание покрытых полимером SPION, но в то же время приводила к удержанию и концентрированию полимера (проиллюстрировано на фиг.11).

В заключение, было обнаружено, что ни фильтрация с мембраной TFF 300 кДа, ни фильтрация с мембраной TFF 100 кДа, не позволяет очистку НМ-PMAcOD-SPION от несвязанного материала НМ-PMAcOD.

в) Очистка низкомолекулярных покрытых PMAcOD SPION

Во втором подходе низкомолекулярные покрытые PMAcOD SPION очищали с использованием TFF (фильтрующая мембрана 100 кДа). Вновь, проводили анализ образцов ретентата и пермеата с использованием эксклюзионной хроматографии для мониторинга процесса очистки TFF. Результаты представлены на фиг.12 для двух партий (партии MX0373A и MX0374A).

Использование LM-PMAcOD (M_n от 3000 до 5000 г/моль) продемонстрировало эффективную диффузию несвязанного полимера через мембрану TFF 100 кДа и удаление более 90% несвязанного полимера из LM-PMAcOD-SPION.

Хроматограммы SEC продуктов после покрытия (MX0373A и MX0374A), очистка посредством TFF (мембрана 100 кДа) (MX0373E и MX0374E) и конечная фильтрация через 0,1-мкм фильтр (MX0373F и MX0374F) представлены на фиг.13.

Более того, данные SEC для образцов после очистки посредством TFF (фильтрующая мембрана 100 кДа; партии MX0373E и MX0374E) и после очистки посредством TFF с последующей фильтрацией через 0,1-мкм фильтр (партии MX0373F и MX0374F) представлены в таблице 12 ниже.

Таблица 12:

Продукт	% SPION (a/a)	% агрегатов (a/a)	% удаленного несвязанного полимера
MX0373E	89,0	11,0	80,4
MX0373F	89,5	10,5	
MX0374E	88,7	11,3	78,9
MX0374F	89,2	10,8	

Как можно видеть из приведенных данных, было возможно эффективно очистить

LM-PMACOD-SPION посредством TFF, в то время как очистка HM-PMACOD-SPION была неэффективной и не приводила к чистому продукту.

Пример 8: Безопасность *in vivo* после внутривенной инъекции мышам мицелл на основе низкомолекулярного полимера, содержащих сердцевину из оксида железа, по сравнению с мицеллами на основе высокомолекулярного полимера, о сердцевину из оксида железа

а) Партию MX0194, полученную согласно примеру 3b, инъецировали внутривенно самкам мышей CD1 в дозе 1 ммоль Fe/кг bw и 2 ммоль Fe/кг bw. Одна мышь погибла при дозе 2 ммоль Fe/кг, что было определено как связанное с тестируемым образцом. Мышей умерщвляли через 14 суток после инъекции. Было обнаружено значительное увеличение абсолютной массы органов по сравнению с соответствующими контролями (см. таблицу 13), что было определено как неблагоприятный эффект инъекции тестируемого образца.

б) Партию PMACOD-SPION, полученную согласно примеру 3a, инъецировали внутривенно самкам мышей CD1 3 раза в дозе 1 ммоль Fe/кг bw (всего 3 ммоль Fe/кг bw) с интервалом 14 суток между инъекциями 1 и 2 и инъекциями 2 и 3. Животных умерщвляли через 24 часа после последней инъекции. Было обнаружено только небольшое, но не значительное увеличение массы печени, и не было обнаружено увеличения массы легких (см. таблица 13).

Влияние на массу органа высокомолекулярных наночастиц на основе полимера связано с долговременным неблагоприятным эффектом высокомолекулярного полимера вследствие того факта, что сердцевина из железа была сходной для партий, полученных согласно примеру 8a и 8b.

Результаты сравнительного испытания обобщенно представлены в таблице 13.

Таблица 13:

	Увеличение массы печени [масс.%]	Увеличение массы легких [масс.%]
пример 8a 1 ммоль Fe/кг n=5	17,4*	2,9
пример 8a 2 ммоль Fe/кг n=4	25,0**	26,2**
пример 8b 3 ммоль Fe/кг n=12	5,7	0,7
Увеличение массы органа вычисляют из абсолютной массы органа, где абсолютную массу органа совпадающих по массе тела животных принимают за 100%. *p<0,05;		

**** $p < 0,01$, односторонний Аноа с критерием Даннета**

Таким образом, было показано, что низкомолекулярный полимер обладает более низкой токсичностью, чем высокомолекулярный полимер.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Наночастица, содержащая

а) мицеллу, содержащую амфифильный полимер со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее, и

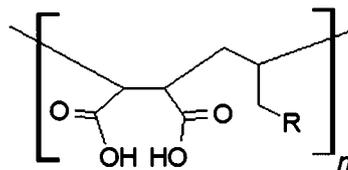
б) по меньшей мере один пептид, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп.

2. Наночастица по п.1, где наночастица дополнительно содержит твердую гидрофобную сердцевину, которая по меньшей мере частично покрыта мицеллами, где сердцевина содержит поддающийся отслеживанию неорганический материал, выбранный из группы, включающей оксид железа, CdSe/CdS/ZnS, серебро и золото.

3. Наночастица по пп.1 или 2, где пептид связан с наружной частью мицеллы.

4. Наночастица согласно предшествующим пп., где амфифильный полимер имеет среднечисловую молекулярную массу (M_n) 10000 г/моль или менее, предпочтительно 6000 г/моль или менее, наиболее предпочтительно от 6000 до 1000 г/моль.

5. Наночастица согласно предшествующим пп., где амфифильный полимер содержит следующий структурный элемент



где R представляет собой гидрокарбильную группу или замещенную гидрокарбильную группу, предпочтительно R представляет собой C₄-C₂₂ алкильную группу, предпочтительно C₈-C₂₀ алкильную группу.

6. Наночастица по п.5, где R представляет собой линейную алкильную группу, предпочтительно линейную C₁₁-C₁₇ алкильную группу, наиболее предпочтительно R представляет собой линейную пентадецильную группу.

7. Наночастица согласно любому из предшествующих пп., где амфифильный полимер выбран из группы, включающей полимер малеиновая кислота-alt-1-октадецен, полимер малеиновая кислота-alt-1-додецен и полимер малеиновая кислота-alt-1-тетрадецен, предпочтительно полимер представляет собой полимер малеиновая кислота-alt-1-октадецен, и

среднечисловая молекулярная масса полимера составляет от 6000 до 1000 г/моль.

8. Наночастица согласно любому из предшествующих пп., где пептид ковалентно связан с мицеллой или ассоциирован нековалентно.

9. Наночастица по любому из предшествующих пп., где наночастица является отрицательно заряженной при pH от 6 до 7.

10. Наночастица по любому из предшествующих пп., где наночастица имеет гидродинамический диаметр от 100 до 10 нм, предпочтительно от 50 до 10 нм, более предпочтительно от 20 до 40 нм при определении с использованием динамического

рассеяния света.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая наночастицу по пп.1-10.

12. Фармацевтическая композиция для применения для подавления специфического иммунного ответа, содержащая наночастицу по пп.1-10.

13. Фармацевтическая композиция для применения для подавления специфического иммунного ответа по п.12, где указанный ответ ассоциирован с аутоиммунным заболеванием, предпочтительно с аутоиммунным заболеванием, выбранным из группы, включающей пемфигус обыкновенный, пемфигус листовидный, приобретенный буллезный эпидермолиз, буллезный пемфигоид, рубцовый пемфигоид, синдром Гудпасчера, микроскопический полиангиит, гранулематоз с полиангиитом (гранулематоз Вегенера), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру, увеит, HLA-B27-ассоциированный острый передний увеит, рассеянный склероз, оптический нейромиелит, диабет типа I, нарколепсию с катаlepsией или без нее, целиакию, герпетиформный дерматит, аллергическое заболевание дыхательных путей/астму, миастению, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грэйвса, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунный гипопаратиреоз, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, синдром Гийена-Барре, аутоиммунную нейтропению, линейную склеродермию, болезнь Баттена, приобретенную гемофилию А, рецидивирующий полихондрит, синдром Айзека (приобретенная нейромиотония), энцефалит Расмуссена, синдром Морвана, синдром мышечной скованности, пернициозную анемию, синдром Фогта-Коянаги-Харада, первичный билиарный цирроз, аутоиммунный гепатит типа I, аутоиммунный гепатит типа II, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, полимиозит/дерматомиозит, синдром Шегрена, склеродермию, витилиго и очаговую алопецию.

14. Способ получения наночастицы, включающий:

i) получение амфифильного полимера со среднечисловой молекулярной массой (M_n) 20000 г/моль или менее,

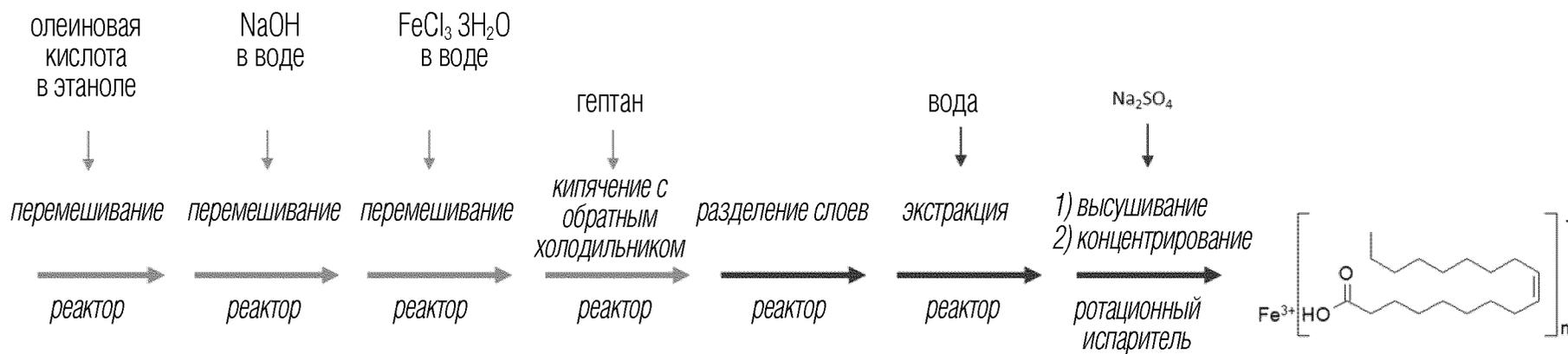
ii) необязательно очистку амфифильного полимера,

iii) формирование мицелл из амфифильного полимера, и

iv) добавление по меньшей мере одного пептида с получением наночастиц.

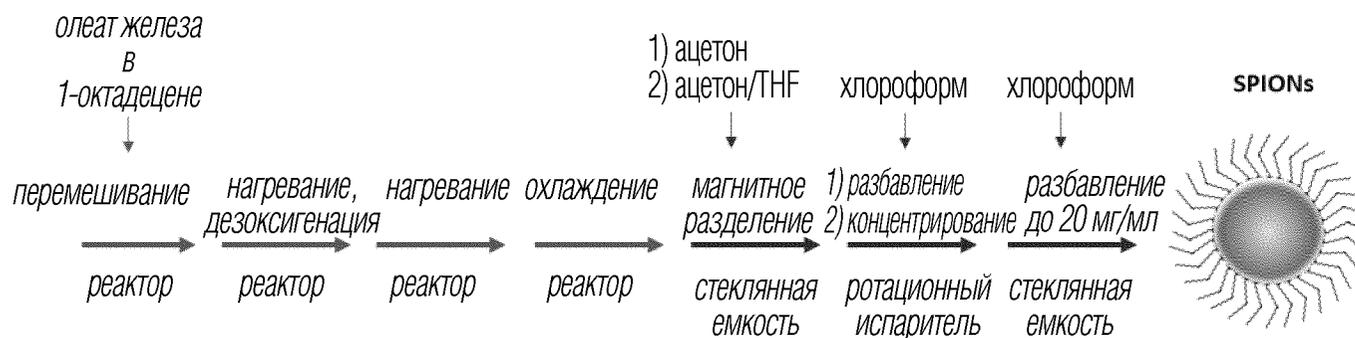
15. Способ по п.14, где стадия i) представляет собой стадию синтеза посредством радикальной сополимеризации, предпочтительно с использованием 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) в качестве радикального инициатора.

ФИГ. 1: БЛОК-СХЕМА СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗО-ОЛЕАТ.

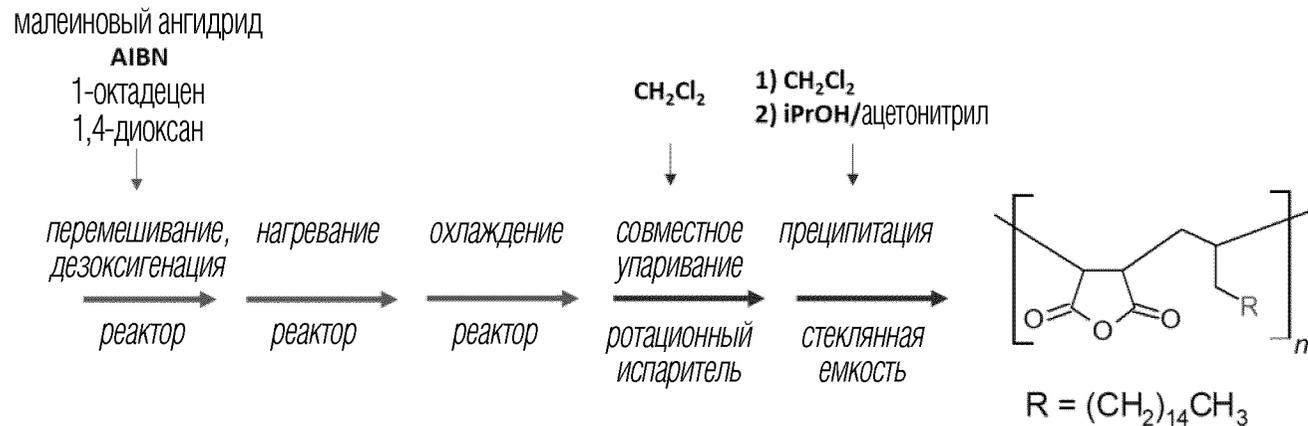


Примечание: светло-синими стрелками указаны стадии синтеза, темно-синими стрелками указаны стадии очистки

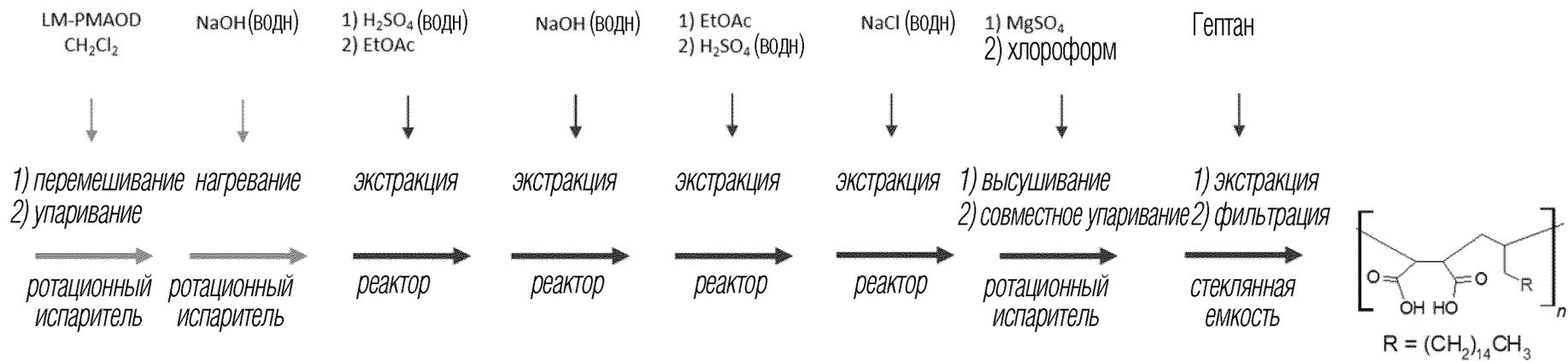
ФИГ. 2: БЛОК-СХЕМА СИНТЕЗА SPION



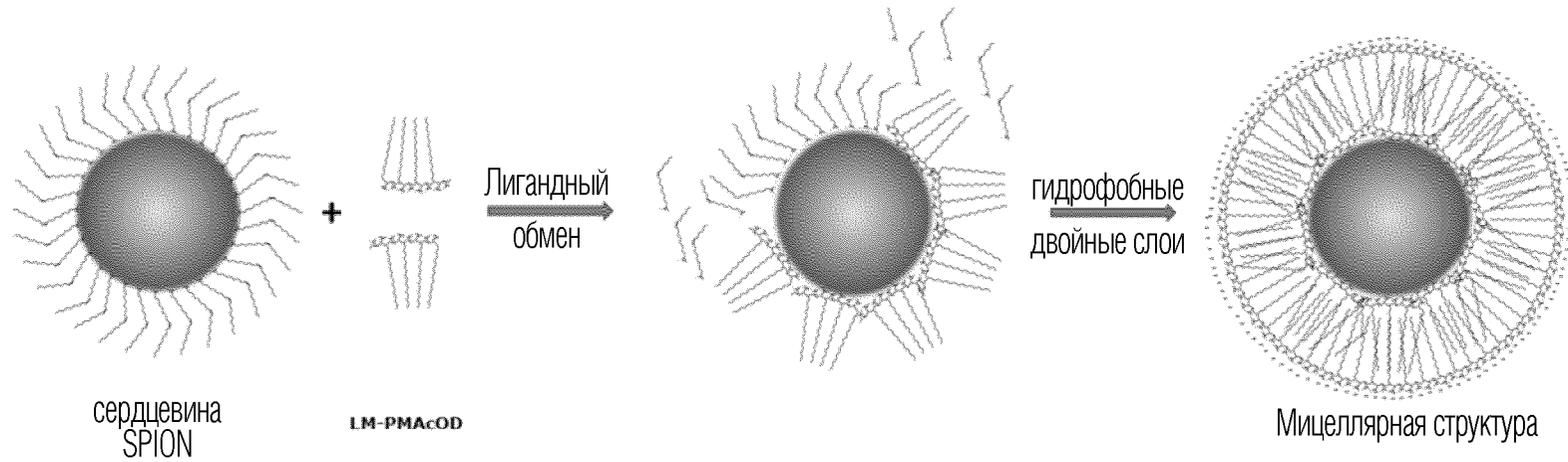
ФИГ. 3: БЛОК-СХЕМА СИНТЕЗА LM-PMAOD



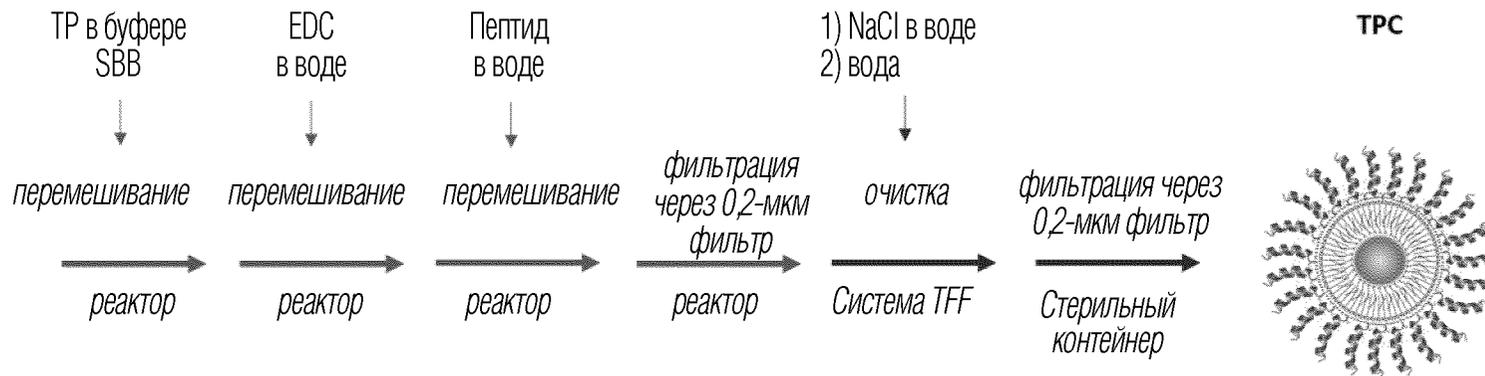
ФИГ. 4: БЛОК-СХЕМА СИНТЕЗА LM-PMAcOD



ФИГ. 5: ПОКРЫТИЕ ПОЛИМЕРОМ SPION

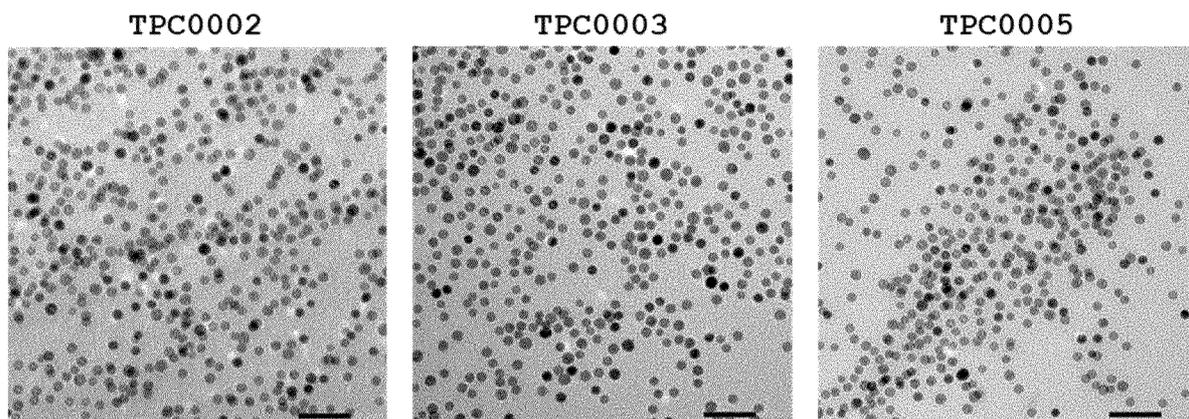


ФИГ. 6: БЛОК-СХЕМА ПРИСОЕДИНЕНИЯ ПЕПТИДА

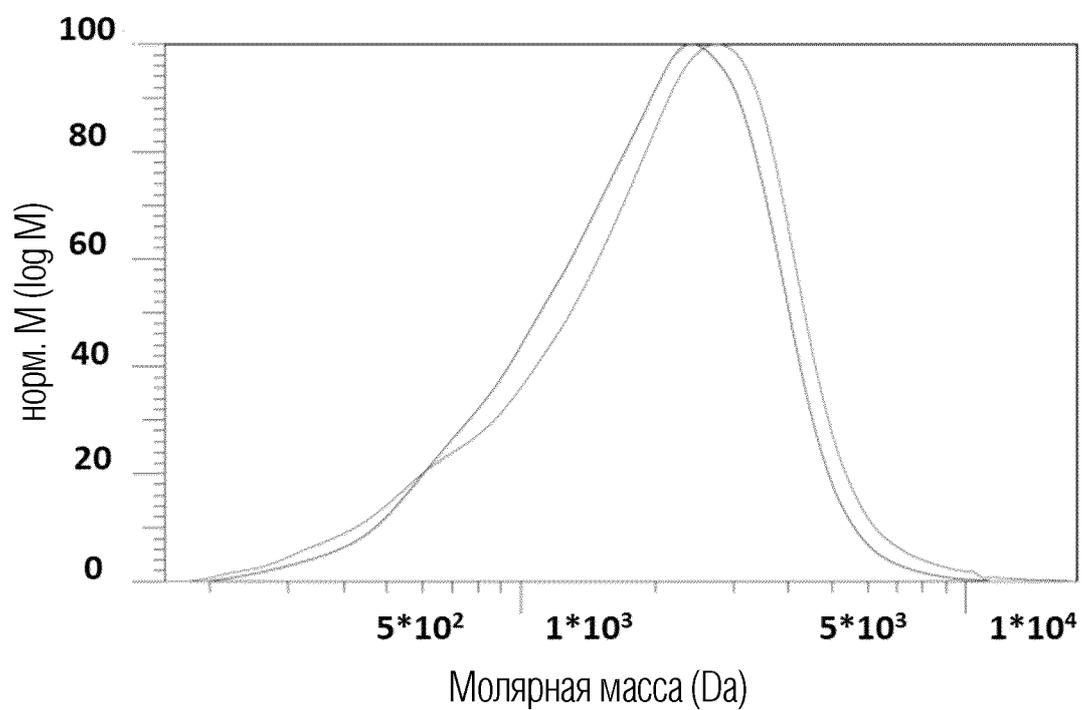


TPC: конъюгат частиц Toras

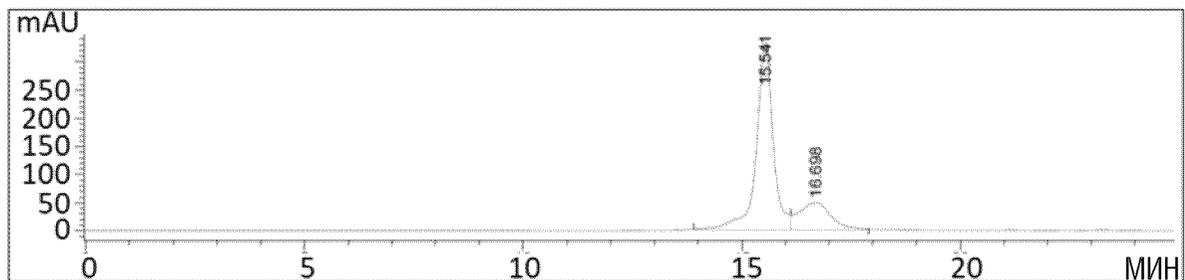
ФИГ. 7: ИЗОБРАЖЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕМ - УВЕЛИЧЕНИЕ 100x



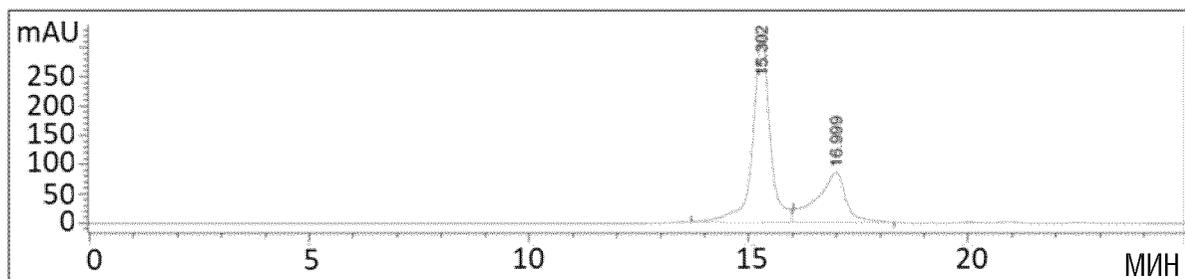
ФИГ. 8: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ LM-PMAcOD



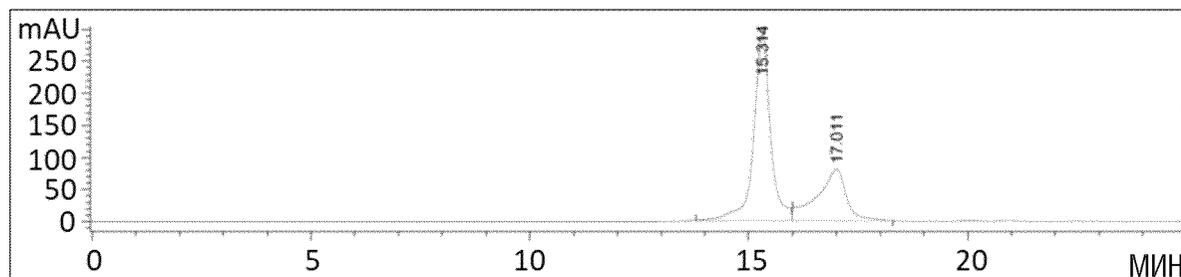
ФИГ. 9: ХРОМАТОГРАММЫ SEC НЕОЧИЩЕННЫХ НМ-РМАсOD-SPION - ДО ОЧИСТКИ ПОСРЕДСТВОМ TFF



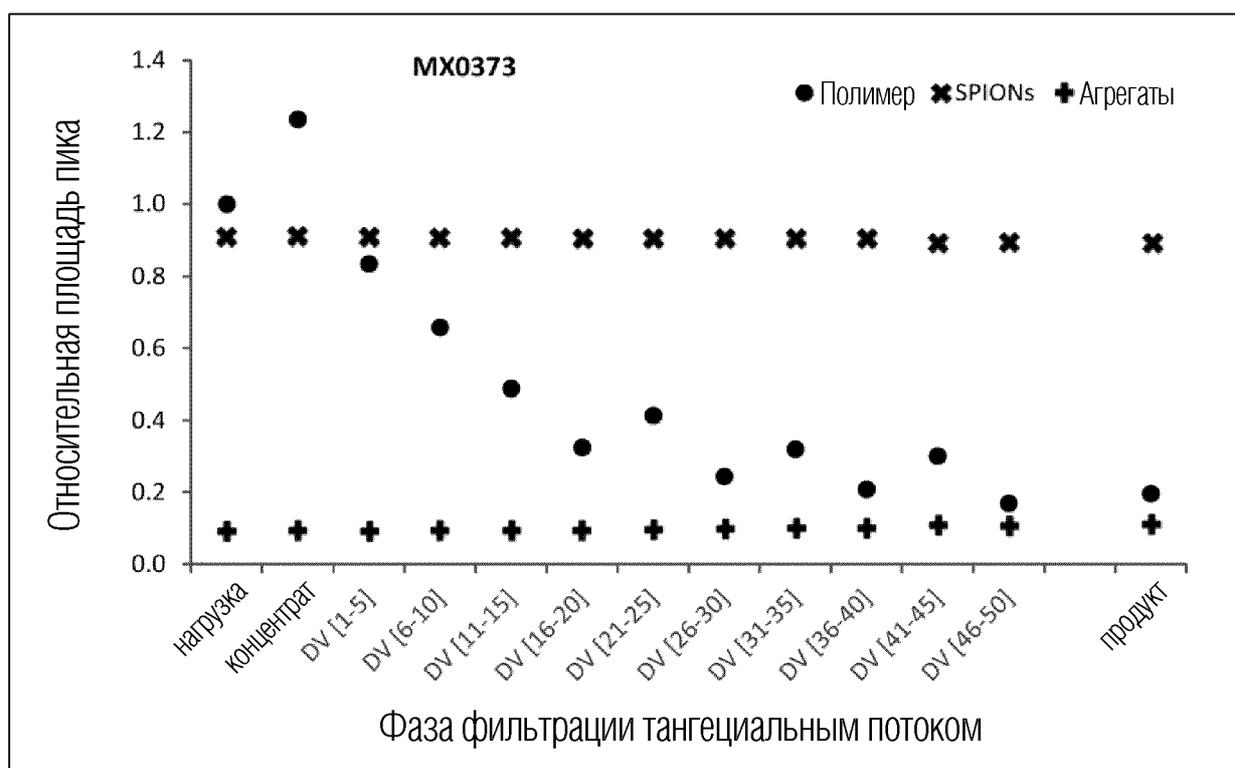
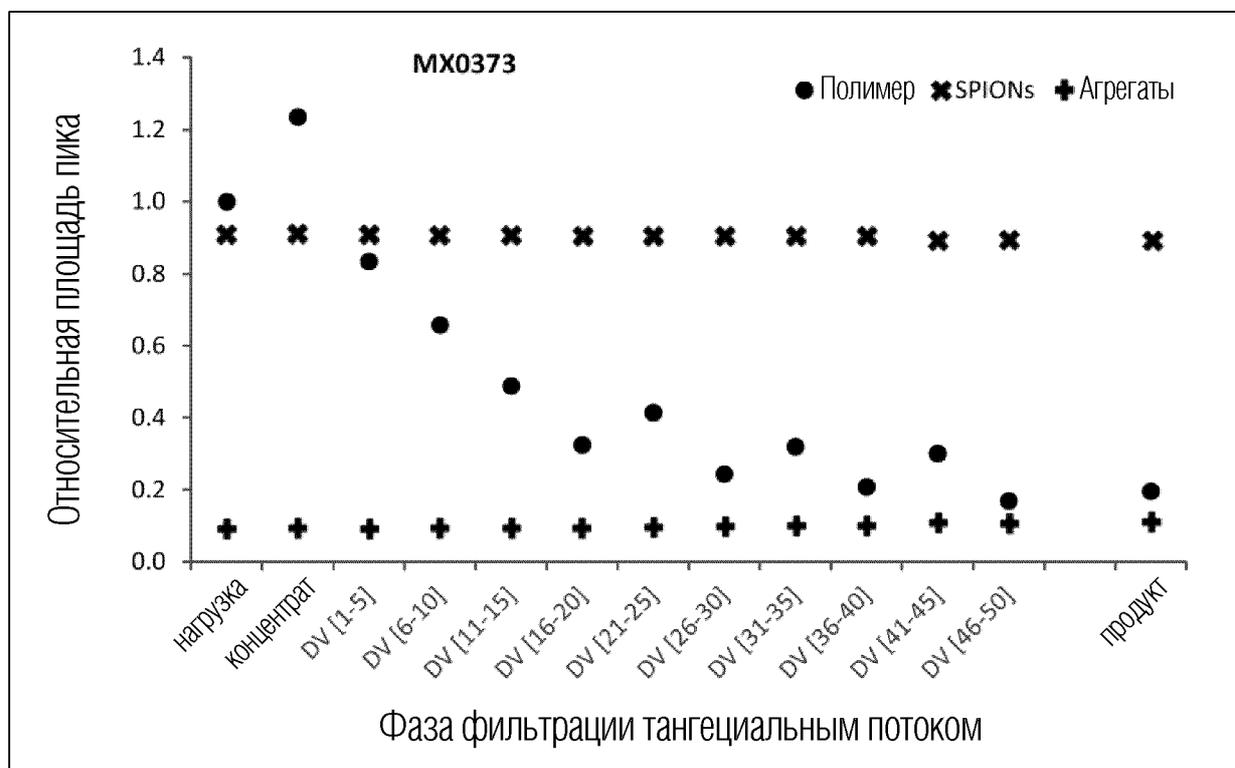
ФИГ. 10: : ХРОМАТОГРАММА SEC ДЛЯ НМ-РМАсOD-SPION В ПЕРМЕАТЕ - ОЧИСТКА ПОСРЕДСТВОМ TFF - ПОРЫ МЕМБРАНЫ 300 кДа



ФИГ. 11: ХРОМАТОГРАММА SEC ДЛЯ НМ-РМАсOD-SPION В РЕТЕНТАТЕ - ОЧИСТКА ПОСРЕДСТВОМ TFF - ПОРЫ МЕМБРАНЫ 100 кДа



ФИГ. 12: РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ SPION, ПОКРЫТЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ PMAcOD



ФИГ. 13: ХРОМАТОГРАММЫ SEC ПРОДУКТОВ ПОСЛЕ ПОКРЫТИЯ (MX0373A И MX0374A), ОЧИСТКИ ПОСРЕДСТВОМ TFF (100-кДа МЕМБРАНА) (MX0373E И MX0374E) И КОНЕЧНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ЧЕРЕЗ 0,1-МКМ ФИЛЬТР (MX0373F И MX0374F)

