

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042292**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.01

(51) Int. Cl. **A61K 9/14** (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890391

(22) Дата подачи заявки
2016.07.29

(54) **МОДУЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ РАСТВОРИМЫХ БИОМОЛЕКУЛ
И СВЯЗАННЫЕ С ЭТИМ СПОСОБЫ**

(31) **62/198,541; 62/198,519; 62/198,531;
62/236,507; 62/319,092**

(32) **2015.07.29; 2015.07.29; 2015.07.29;
2015.10.02; 2016.04.06**

(33) **US**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/US2016/044674**

(87) **WO 2017/019949 2017.02.02**

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

(72) Изобретатель:
Додгсон Джон (GB), Хоторн Луи (US)

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

(56) **WO-A1-2016054522
US-A1-2004265392
WO-A2-2014109842**

**CAUDA, Valentina, et al. Multiple core?
shell functionalized colloidal mesoporous silica
nanoparticles. Journal of the American Chemical
Society, 2009, 131.32: 11361-11370, DOI:
10.1021/ja809346n, 22 Jul 2009 (2009/07/22) the
whole document**

(57) В изобретении, среди прочего, представлены композиции, которые связываются и ингибируют биологическую активность растворимых биомолекул, а также их фармацевтические композиции. Композиции могут содержать множество частиц, которые специфически связывают мишень, например растворимую биомолекулу или биомолекулу на поверхности патогена, чтобы ингибировать взаимодействие мишени (или патогена) с другими молекулами или клетками.

B1**042292****042292****B1**

Притязание на приоритет

Эта заявка испрашивает приоритет предварительной патентной заявки США № 62/198531, поданной 29 июля 2015 г.; предварительной патентной заявки США № 62/198519, поданной 29 июля 2015 г.; предварительной патентной заявки США № 62/198541, поданной 29 июля 2015 г.; предварительной патентной заявки США № 62/236507, поданной 2 октября 2015 г.; и предварительной патентной заявки США № 62/319092, поданной 6 апреля 2016 г.; каждая из которых включена настоящим посредством ссылки во всей своей полноте.

Уровень техники

Десятки видов противораковой терапии, доступных клинически или находящихся на стадии разработки, включают стимуляцию способности иммунной системы либо для распознавания, либо для разрушения рака, либо для того и другого. Тремя наиболее известными являются ингибиторы контрольных точек Yervoy® (ипилимумаб) от Bristol-Myers Squibb, Keytruda® (пембролизумаб, раньше ламбролизумаб) от Merck. Однако эти и другие подходы включают общую повышающую регуляцию иммунной системы больного, индуцируя потенциально серьезные симптомы, похожие на аутоиммунные расстройства и/или другие значительные побочные эффекты.

В данной области имеется потребность в более эффективных фармакологических подходах для борьбы с раком, в частности с метастатическим раком, не затрагивающих возможности больного избежать аутоиммунитета. Среди прочего, настоящее раскрытие предоставляет способы и композиции, основанные на альтернативных подходах использования собственной иммунной системы больного против рака, включая дезингибирование микроокружения опухоли, т.е. ослабление защитной системы опухоли, в противовес стимулированию иммунных клеток.

Сущность

Раскрытие, среди прочего, предоставляет композиции, которые связывают биомолекулы и ингибируют их биологическую активность, особенно растворимых молекул, а также их фармацевтические композиции. Также в данном документе предоставлен ряд вариантов применения, в которых используются композиции. Например, композиции, описанные в данном документе, используются для ингибирования пролиферации, роста и/или жизнеспособности клетки, например, раковой клетки. Кроме того, композиции, описанные в данном документе, полезны для предотвращения и/или лечения старения, нарушений обмена веществ и нейродегенеративных заболеваний. В еще одном примере композиции, описанные в данном документе, могут быть полезны для связывания токсинов (например, зоотоксинов, бактериальных токсинов и/или растительных токсинов), вирусов или других чужеродных соединений и их нейтрализации в кровотоке больного.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 изображает иллюстративный вариант осуществления частицы, которая связывает растворимые формы рецептора TNF (sTNF-R). Частица составляет приблизительно один кубический микрометр. Внутренние поверхности частицы содержат иммобилизованный агент TNF, который способен связываться с sTNF-R-мишенью и изолировать (очищать) ее от своих естественных лигандов, ингибируя посредством этого взаимодействия между sTNF-R-мишенью и другими белками и клетками. Внутренние поверхности частицы образуют границы, содержащие пустое пространство.

Фиг. 2 изображает иллюстративный вариант осуществления частицы, содержащей агент TNF, который связывает растворимые формы рецептора-мишени TNF (sTNF-R). Три частицы, показанные на фиг. 2, изображены связывающими 0, 3 или 10 молекул sTNF-R-мишени. Кольцеобразная частица имеет диаметр приблизительно 175 нм, хотя агент TNF и sTNF-R-мишень показаны не в масштабе. Внутренние поверхности частицы заключают в себе иммобилизованный агент TNF, который способен связываться с sTNF-R-мишенью и изолировать (очищать) ее от своих естественных лигандов, ингибируя посредством этого взаимодействия между sTNF-R-мишенью и другими белками и клетками. Внутренняя часть кольцеобразной частицы содержит пустое пространство.

Фиг. 3 изображает иллюстративные варианты осуществления частиц, содержащих выступы. Частица слева на фиг. представляет собой восьмигранник с сердцевинкой, имеющий самый длинный размер 100-150 нм. Частица справа на фиг. представляет собой икосаэдр с сердцевинкой, имеющий самый длинный размер 200-300 нм. Каждая частица дополнительно содержит молекулярные выступы, направленные наружу от вершин коровой многогранной структуры. Частицы изображены содержащими агент, показанный темно-серым, а некоторые частицы изображены связывающими мишень (например, биомолекулу), показанную светло-серым, и идентифицированы как 0 или 3 "ловушки". Выступы служат в качестве "репеллентов клеток", которые ингибируют взаимодействия между мишенью, связанной с агентом частицы, и клеточными поверхностями. Изображения частиц, выступов, агента и связанной мишени на фиг. 3 необязательно показаны в масштабе.

Фиг. 4 состоит из двух панелей, меченных как панели (A) и (B). На панели (A) изображена упаковка субчастиц внутри частицы, содержащей коровые субчастицы и защищающие субчастицы, при этом каждая субчастица по существу является сферической и имеет приблизительно одинаковый размер. Тем не менее, частица может содержать субчастицы различных форм и/или размеров. Кроме того, субчастицы показаны в виде упаковки с гексагональной схемой; однако, субчастицы могут быть упакованы случай-

ным образом или иметь иную геометрию. На панели (B) изображены (i) "иммобилизованные лиганды" (т.е. агент), которые иммобилизованы на поверхности коровых субчастиц, (ii) мишени (например, биомолекулы), специфически связанные с агентом, и (iii) мишени внутри заполненного текучей средой пустого пространства частицы. На панели (B) не показаны защищающие субчастицы. Относительные размеры субчастиц, иммобилизованных лигандов, мишеней и пустого пространства на фиг. 4 необязательно показаны в масштабе.

Фиг. 5 состоит из четырех панелей, меченных как панели (A), (B), (C) и (D). Каждая панель изображает субчастицы частицы, при этом коровые субчастицы показаны серыми, а защищающие субчастицы показаны белыми. Каждая частица содержит 55 коровых субчастиц. На панелях (A) и (B) показаны изображения частиц, которые являются перпендикулярными изображениям, показанным на панелях (C) и (D). На панелях (A) и (C) изображены только коровые субчастицы, а на панелях (B) и (D) изображены коровые субчастицы и ряд защищающих субчастиц. Полная частица, содержащая коровые субчастицы и защищающие субчастицы, предпочтительно покрыта по меньшей мере одним слоем защищающих субчастиц, который ни на одной панели полностью не показан. На фиг. 5 каждая коровая субчастица и защищающая субчастица является по существу сферической и имеет приблизительно одинаковый размер; однако субчастицы внутри частицы могут варьировать по форме и/или размеру. Кроме того, субчастицы фиг. 5 показаны в виде упаковки с гексагональной схемой; однако, субчастицы частицы могут быть упакованы с иной геометрией или они могут быть упакованы случайным образом. Относительные размеры субчастиц, иммобилизованных лигандов, мишеней и пустого пространства на фиг. 5 необязательно показаны в масштабе.

Фиг. 6 состоит из 6 панелей, меченных как панели (A), (B), (C), (D), (E) и (F). На каждой панели показано изображение по существу 2-мерной частицы. В каждой панели кружки изображают агент, который иммобилизован на поверхности частицы. По существу 2-мерные частицы могут содержать "пустое пространство", например, между плечами креста или звезды. Панель (A) изображает "вид сверху" частицы, имеющей форму креста, а панель (B) изображает перпендикулярный "вид сбоку" такой же крестобразной частицы. "Форма креста" панели (A) представляет собой "по существу 2-мерную форму", а перпендикулярный "вид сбоку" представляет собой третье измерение, которое не содержит 2-мерную форму. "Вид сбоку" показывает, что по существу 2-мерная частица может содержать разные поверхности, т.е. "внутреннюю поверхность", на которой иммобилизован агент (черный), и "наружную поверхность" (т.е. "внешнюю поверхность"), которая по существу не содержит агент (серый). Разные поверхности могут содержать разные материалы, например, частица может быть слоистой, или разные поверхности могут быть получены, например, путем маскировки одной поверхности, тогда как другая поверхность поперечно сшита с агентом или покрывающей молекулой. В зависимости от размера частицы и природы агента и мишени, форма креста в разной степени будет ингибировать взаимодействия между связанной мишенью (например, биомолекулой) и другими белками или клетками. Например, для дополнительного ингибирования таких взаимодействий можно регулировать геометрию частицы. На панели (C) показана частица, имеющая геометрию 6-конечной звезды, которая может ингибировать взаимодействия между связанной мишенью и другими белками или клетками в большей степени, чем крестобразная частица панели (A). На панели (D) показана 3-конечная звезда, которая может только минимально ингибировать взаимодействия между связанной мишенью и другими белками или клетками. Тем не менее, частицы, имеющие геометрию 3-конечной звезды, можно модифицировать, чтобы в большей степени ингибировать взаимодействия между связанной мишенью и другими белками или клетками. Например, на панели (E) показана частица, имеющая геометрию 3-конечной звезды, при этом частицу окружает материал, который по существу не содержит агент, а на панели (F) показана частица, имеющая геометрию 3-конечной звезды (т.е. содержащая четыре 3-конечных звезды), имеющая внешние поверхности, которые по существу не содержат агент.

На фиг. 7 показана частица, содержащая реакционноспособную группу, и агент, содержащий функциональную группу. Объединение частицы и агента может таким образом образовывать ковалентную или нековалентную связь между реакционноспособной группой и функциональной группой, в зависимости от природы каждой группы.

На фиг. 8 показана частица, содержащая реакционноспособную группу, линкер, содержащий функциональную группу, и агент. Объединение частицы и линкера может таким образом образовывать ковалентную или нековалентную связь между реакционноспособной группой и функциональной группой, в зависимости от природы каждой группы. Затем комплекс частица/линкер может быть объединен с агентом с образованием ковалентной или нековалентной связи между линкером и агентом, посредством этого связывая частицу с агентом.

Подробное описание

В раскрытии представлены композиции и способы изоляции растворимых биомолекул от их естественной окружающей среды, например, для ингибирования посредством этого биологической активности растворимой биомолекулы. Например, в раскрытии представлена частица или множество частиц, имеющих поверхность, содержащую агент (например, иммобилизованный на поверхности частицы), который избирательно связывает растворимую биомолекулу. После того как растворимая биомолекула свя-

зывается агентом, она изолируется частицей таким образом, что растворимая биомолекула имеет пониженную способность (например, существенно пониженную способность или не имеет возможности) взаимодействовать с другими естественными партнерами по связыванию растворимой биомолекулы. Таким образом, растворимая биомолекула становится инертной.

Различные аспекты раскрытия относятся к частицам, содержащим реакционноспособные группы, выполненные с способностью связывания агента с частицами. Таким образом, частица может не содержать агент, но, тем не менее, частица может быть способна соединяться с агентом. С частицей можно соединять разные агенты в зависимости от природы биомолекулы, подлежащей утилизации.

В некоторых аспектах раскрытие относится к набору, содержащему частицы и линкеры. Например, линкеры можно выбирать для реакции с агентом, содержащим фрагмент, специфический к частицам. Таким образом, единственная "универсальная утилизирующая" частица может быть предоставлена в наборе с рядом разных линкеров для связывания ряда агентов разных типов с частицей (например, при этом разные линкеры способны связывать разные фрагменты с одной и той же частицей).

Реакционноспособные группы частицы предпочтительно выполнены так, что агент, связанный с частицей, имеет более высокую избирательность для растворимых форм биомолекулы-мишени, чем для мембраносвязанных или поверхностно-связанных форм биомолекулы. Например, агент, который не связан с частицей, может связывать растворимые и мембраноассоциированные формы биомолекулы с аналогичной аффинностью связывания (например, с аналогичной константой k_a ассоциации и/или аналогичной константой равновесия K_D). Агент, связанный либо непосредственно с реакционноспособной группой частицы, либо опосредованно с реакционноспособной группой частицы (например, через линкер) может демонстрировать более высокую аффинность связывания (например, более высокую k_a и/или более низкую K_D) для растворимых форм биомолекулы-мишени относительно мембраноассоциированных форм одной и той же биомолекулы.

В предпочтительных вариантах осуществления каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп выполнена на частице таким образом, что агент, связанный с реакционноспособной группой, (либо непосредственно, либо опосредованно, например, через линкер) имеет более низкую аффинность связывания для мембраноассоциированных форм биомолекулы-мишени, чем когда агент не связан с реакционноспособной группой частицы (например, вместо этого агент либо находится в растворе, либо связан с открытой поверхностью). Например, реакционноспособная группа может быть выполнена на частице таким образом, что агент, связанный с реакционноспособной группой, (либо непосредственно, либо опосредованно, например, через линкер), имеет более низкую константу k_a ассоциации для мембраноассоциированных форм биомолекулы-мишени, чем когда агент не связан с реакционноспособной группой частицы. k_a агента, который связан с частицей (k_a , частица) может быть меньше чем k_a агента, либо находящегося в растворе, либо связанного с открытой поверхностью (k_a , свободный), для мембраносвязанных форм биомолекулы-мишени приблизительно на 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 или 0,001 (например, k_a , частица - k_a , свободный $\leq$ 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 или 0,001 для агента и мембраносвязанных мишеней). Аналогично, реакционноспособная группа может быть выполнена на частице таким образом, что агент, связанный с реакционноспособной группой, (либо непосредственно, либо опосредованно, например, через линкер), имеет более высокую константу равновесия K_D для мембраноассоциированных форм биомолекулы-мишени, чем когда агент не связан с реакционноспособной группой частицы. K_D агента, связанного с частицей (K_D , частица), может быть больше, чем K_D агента, либо находящегося в растворе, либо связанного с открытой поверхностью (K_D , свободный), для мембраносвязанных форм биомолекулы-мишени приблизительно на 10, 20, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 5000, 10,000, 50,000, или 100,000% (например, K_D , частица - K_D , свободный $\leq$ 1,1, 1,2, 1,25, 1,5, 2,0, 2,5, 3,5, 5,0, 10, 5, 100, 500 или 1000 для агента и мембраносвязанных мишеней).

В предпочтительных вариантах осуществления частица выполнена так, что связывание агента с реакционноспособной группой частицы по существу не затрагивает аффинность связывания агента для растворимых форм биомолекулы-мишени (например, относительно того, когда агент не связан с реакционноспособной группой частицы, а вместо этого агент либо находится в растворе, либо связан с открытой поверхностью). Например, реакционноспособная группа может быть выполнена на частице таким образом, что агент, связанный с реакционноспособной группой, (либо непосредственно, либо опосредованно, например, через линкер), имеет приблизительно такую же константу k_a ассоциации для растворимых форм биомолекулы-мишени относительно того, когда агент не связан с реакционноспособной группой частицы. k_a агента, связанного с частицей (k_a , частица) может быть приблизительно такой же, как k_a агента, либо находящегося в растворе, либо связанного с открытой поверхностью (k_a , свободный), для растворимых форм биомолекулы-мишени (например, k_a , частица - k_a , свободный может быть от 0,1 до 10, например, 0,2-5, 0,5-2, 0,8-1,2 или 0,9-1,1 для агента и растворимых мишеней). Аналогично, реакционноспособная группа может быть выполнена на частице таким образом, что агент, связанный с реакционноспособной группой, (либо непосредственно, либо опосредованно, например, через линкер), имеет приблизительно такую же константу K_D равновесия для растворимых форм биомолекулы-мишени относительно того, когда агент не связан с реакционноспособной группой частицы. K_D агента, связанного с частицей

(K_D , частица) может быть приблизительно такой же, как K_D агента, либо находящегося в растворе, либо связанного с открытой поверхностью (K_D , свободный), для растворимых форм биомолекулы-мишени (например, K_D , частица - K_D , свободный может быть от 0,1 до 10, например, 0,2-5, 0,5-2, 0,8-1,2 или 0,9-1,1 для агента и растворимых мишеней).

Частицы, содержащие множество реакционноспособных групп, могут таким образом быть связаны с агентом (например, антителом, Fab, scFv или лигандом рецептора клеточной поверхности) для конструирования частиц, которые избирательно связывают растворимые формы мишени (например, антиген и/или растворимую форму рецептора клеточной поверхности), но которые не связывают в значительной мере мембраносвязанные формы мишени. Такие частицы могут использоваться *in vivo* или *in vitro*, например, для понижения концентрации растворимой мишени в текучей среде, не открывая агент для мембраносвязанных форм мишени.

I. Биомолекула.

Растворимая биомолекула обычно составляет первый элемент пары специфического связывания. Как использовано в данном документе, "партнер по связыванию", "специфический партнер по связыванию" или "элемент пары специфического связывания" обычно содержит любой элемент пары элементов связывания, которые связываются друг с другом с существенной аффинностью и специфичностью. Пара партнеров по связыванию могут связываться друг с другом, по существу исключая по меньшей мере большую часть или по меньшей мере по существу все другие компоненты образца, и/или могут иметь константу диссоциации менее чем приблизительно 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} или 10^{-8} М, среди прочих. Пара партнеров по связыванию может "вставать" вместе предварительно заданным образом, что основано на множестве атомных взаимодействий с совместным увеличением специфичности и аффинности. Партнеры по связыванию среди прочего могут быть получены из биологических систем (например, взаимодействия рецептор-лиганд), химических взаимодействий и/или с помощью технологии молекулярного импринтинга. В табл. 1 представлены иллюстративные соответствующие пары партнеров по связыванию, также называемые пары специфического связывания, с обозначениями "первый" и "второй", являющимися произвольными и взаимозаменяемыми.

Термин "биомолекула", как использовано в данном документе, относится к любой молекуле, которая может оказывать воздействие на живой организм. В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой атом, например, лития или свинца (например, биомолекулой может быть катион металла). В некоторых вариантах осуществления биомолекула - это не атом или ион металла. Например, биомолекулой может быть молекула, например, органическое соединение или неорганическое соединение. В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой лекарственное средство, например, варфарин или дабигатран. Биомолекулой может быть психоактивное лекарственное средство, например, диацетилморфин. Биомолекула может представлять собой отравляющее вещество, токсин или яд. Биомолекулой может быть аллерген. Биомолекулой может быть канцероген. Биомолекулой может быть боевой химический агент, например, отравляющее вещество нервно-паралитического действия. Биомолекулой может быть молекула, которая является эндогенной для организма, например, гормон, цитокин, нейромедиатор, растворимый внеклеточный рецептор, антитело или растворимый белок матрикса. Биомолекулой может быть пептид, полипептид, белок, нуклеиновая кислота, углевод или сахар. Биомолекула может включать пептид, полипептид, белок, нуклеиновую кислоту, углевод или сахар. Биомолекулой может быть неправильно свернутый белок. Биомолекулой может быть амилоид или растворимый предшественник амилоида. "Полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и означают любую цепь аминокислот с пептидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации. Биомолекулой может быть липид, стероид или холестерин.

Биомолекула может включать липид, стероид или холестерин. Биомолекулой может быть циркулирующая в кровотоке внеклеточная нуклеиновая кислота, например, циркулирующая в кровотоке внеклеточная рНК. Биомолекулой может быть микро рНК (miRNA).

Биомолекулой может быть биомолекула, которая секретируется клеткой (например, клеткой млекопитающего). Биомолекулой может быть внеклеточная область мембранного белка, которая склонна к расщеплению до растворимой формы. Биомолекулой может быть цитозольная биомолекула. Например, биомолекулой может быть цитозольная биомолекула, которая высвобождается *in vivo* после апоптоза, или частица может использоваться *in vitro* в способе, в котором цитозольная биомолекула находится в растворе.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления биомолекула представляет собой растворимую биомолекулу. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления мишенью является растворимая биомолекула. Тем не менее, частица может выделять биомолекулы, которые не являются растворенными в водном растворе веществами, и/или которые не взаимодействуют с партнерами по связыванию на клеточной поверхности. Например, частица может специфически связывать биомолекулу, которая ассоциирована с белковым агрегатом, например, амилоидным или прионовым агрегатом. Такие частицы могут обеспечивать терапевтическую пользу за счет разборки агрегата (например, за счет сдвига термодинамического равновесия от агрегатных состояний) и/или за счет изолирования агрегата (например, чтобы ингибировать дальнейшую агрегацию и/или обеспечить выведение связанного агрегата).

Аналогично, частица может специфически связывать кристаллический кальций или гидроксиапатит. Аналогично, частица может специфически связывать биомолекулу, которая ассоциирована с вирусом или клеткой, такой как клетка бактерий, простейших, грибов или дрожжей, например, при этом биомолекула не является веществом, растворенным в водном растворе, но биомолекула разделена на мембрану, клеточную стенку или капсид. Таким образом, частица может изолировать патогенный вирус или клетку, ослабляя посредством этого патогенность вируса или клетки. Частица может специфически связывать биомолекулу, которая ассоциирована с внеклеточной везикулой, такой как эктосома, экзосома, слущенная везикула или апоптотное тельце. Частица может специфически связывать липопротеин низкой плотности, например, чтобы изолировать частицы липопротеина низкой плотности.

Биомолекулой может быть лиганд рецептора клеточной поверхности. Лигандом может быть существующий в природе лиганд или синтетический лиганд. Лигандом может быть нативный лиганд рецептора (например, лиганд, который вырабатывается больным *in vivo*) или ненативный лиганд (например, лиганд, который вводят больному, например, вирус или лекарственное средство). Биомолекулой может быть лиганд для цитозольного рецептора или ядерного рецептора.

Таблица 1

Примеры пар специфического связывания

Первый Партнер по связыванию	Второй Партнер по связыванию
Рецептор клеточной поверхности (напр., рецептор TNF)	Естественный лиганд (напр., TNF α)
Белок покрытия или оболочки вируса (напр., HIV-1 gp120)	Соответствующий клеточный рецептор (напр., CD4)
Ботулинический Токсин	Рецептор клеточной поверхности синаптоагмин II
Растворимый рецептор (напр., растворимый TNFR или растворимый рецептор IL-2)	Естественный лиганд (напр., TNF α или IL-2)

Известно, что клетки опухоли защищают себя от иммунного надзора хозяина путем слушивания растворимых форм рецепторов цитокинов, эти растворимые рецепторы связывают цитокины, продуцируемые иммунными клетками в микроокружении опухоли. Например, раковые клетки слушивают растворимые формы рецептора TNF и других рецепторов цитокинов, например, рецептор IL-2 и рецептор TRAIL. Эти растворимые рецепторы придают раковым клеткам преимущество в росте, освобождая клетки от проапоптотических действий TNF α , IL-2 и TRAIL. Karpatova et al. сообщают о слушивании рецептора ламинина 67kD раковыми клетками человека, которое может усиливать инвазию и метастазирование опухоли (J Cell Biochem 60(2):226-234 (1996)). Таким образом, можно сконструировать частицы, описанные в данном документе, для утилизации растворимых форм рецепторных белков клеточной поверхности, например, для применения в лечении рака.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности экспрессируется раковой клеткой, и/или рецепторным белком клеточной поверхности является белок, слущиваемый раковой клеткой в виде растворимой формы рецепторного белка клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления рецепторный белок клеточной поверхности, при активации, индуцирует апоптоз (например, рецептор смерти). В некоторых вариантах осуществления рецепторным белком клеточной поверхности является рецепторный белок фактора некроза опухоли (TNFR) (например, TNFR-1 или TNFR-2). В некоторых вариантах осуществления рецепторным белком клеточной поверхности является рецепторный белок Fas. В некоторых вариантах осуществления рецепторным белком клеточной поверхности является рецепторный белок к апоптоз-индуцирующему лиганду семейства TNF (TRAILR), рецепторный белок 4-1BB, белок CD30, рецепторный белок EDA, белок HVEM, рецепторный белок лимфотоксин-бета, белок DR3 или рецепторный белок TWEAK. В некоторых вариантах осуществления рецепторным белком клеточной поверхности является рецепторный белок интерлейкина, например, рецепторный белок IL-2. Понятно, что в таких вариантах осуществления растворимой биомолекулой-мишенью может быть растворимая форма рецептора клеточной поверхности, например, слущенная с раковой клетки.

В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой растворимый Tim3 ("T-Клеточный Ig Муцин 3"). Растворимый Tim3 (sTim3) вовлечен в аутоиммунное заболевание и рак, а повышенный sTim3 ассоциирован с ВИЧ-инфекцией. Связь галектина 9 ("Gal9") и возможно других лигандов с Tim3 в гетеродимерном соединении с CEACAM1 приводит к ингибированию T-клеточных ответов, а совместная блокада Tim3 и CEACAM1 приводит к противоопухолевому иммунному ответу. Соответственно, биомолекулой может быть sTim3 или естественный лиганд для sTim3, например Tim3L или Gal9. Биомолекулой может быть растворимая изоформа CEACAM1. Таким образом, частицы могут быть приспособлены к утилизации sTim3, не ингибируя в то же время взаимодействие между Gal9 и мембраносвязанным Tim3 (mTim3). Аналогичным образом, агентом может быть sTim3, антитело, селективное для

sTim3 (или его антигенсвязывающий участок) или лиганд для Tim3. Агентом может быть естественный лиганд для CEACAM1 (например, Gal9 или его вариант) или антитело, селективное либо для CEACAM1, либо для его растворимой изоформы. Любая из вышеупомянутых частиц может использоваться, например, в способах лечения рака, способах лечения ВИЧ-инфекции и способах лечения аутоиммунного заболевания, например, заболевания трансплантат против хозяина.

В некоторых вариантах осуществления биомолекулой может быть Gal9 (Галектин 9). Частица может содержать агент, селективный для Gal9, например, естественный лиганд для Gal9, например, Tim3 или его вариант, или антитело, селективное для Gal9. Таким образом, частицы могут быть приспособлены к утилизации Gal9, не ингибируя в то же время взаимодействия мембраносвязанного Gal9 (mGal9) с мембраносвязанным Tim3 (mTim3). В некоторых вариантах осуществления биомолекулой может быть растворимая изоформа CEACAM1 ("sCEACAM1"). Агентом может быть естественный лиганд для sCEACAM1, например, Gal9 или его вариант, или антитело, селективное либо для CEACAM1, либо для растворимой изоформы CEACAM1.

В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой растворимый CTLA4. Растворимый CTLA4 ("SCTLA4") вовлечен в рак, и антитела, активные против SCTLA4, но не против мембраносвязанного CTLA4 ("mCTLA4"), эффективны в животных моделях рака. В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой SCTLA4. Агентом может быть естественный лиганд для CTLA4, например, растворимый B7-1 или растворимый B7-2 или его вариант, или антитело, селективное для CTLA4, например, ипилимумаб или тицилимумаб. Таким образом, частицы могут быть приспособлены к утилизации SCTLA4 без ингибирования взаимодействия между лигандами и mCTLA4. Таким образом, SCTLA4 может выводиться из микроокружения опухоли ("TME") и/или из кровотока за пределы TME, оставляя в то же время свободный mCTLA4 для взаимодействия в виде части нормального иммунного ответа. Частицы, которые выделяют SCTLA4, могут использоваться, например, в способах лечения рака.

Растворимый PD-1 ("sPD1") вовлечен в такие аутоиммунные заболевания, как ревматоидный артрит. Избыток sPD1 может нарушать баланс между PD1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2, приводя к аутоиммунной реакции. Таким образом, биомолекулой может быть sPD1. Агентом может быть естественный лиганд для sPD1, например, PD-L1, PD-L2, или его вариант, или антитело, селективное для PD1, например, блокирующее PD1 лекарственное средство, например, ниволумаб, пидилизумаб или пембролизумаб (Keytruda®). Таким образом, частица может быть приспособлена к утилизации sPD1 без ингибирования взаимодействия PD-L1 или PD-L2 с мембраносвязанным PD1. Такие частицы могут использоваться, например, в способах лечения аутоиммунных заболеваний, например, артрита.

LAG3 представляет собой рецептор поверхности Т-клеток, который при связывании своим лигандом приводит к ингибированию. Растворимые формы LAG3 ("SLAG3") коррелируют с аутоиммунной реакцией, например, при диабете I типа и при других аутоиммунных заболеваниях. SLAG3 могут быть биомолекулой. Агентом может быть естественный лиганд для sLAG3 или его вариант, или антитело, селективное для SLAG3. Таким образом, частица может быть приспособлена к утилизации SLAG3 без ингибирования взаимодействия между лигандами и мембраносвязанным LAG3. Такие частицы могут использоваться, например, в способах лечения аутоиммунного заболевания, например, диабета I типа.

Биомолекулой может быть TNF α . Агент может содержать антитело против TNF α , например, инфликсимаб, адалимумаб, церолизумаб, афелимомаб, нерелимомаб, озорализумаб или голимумаб, или агент может содержать антигенсвязывающий участок антитела против TNF α . Агентом может быть этанерцепт. Агентом может быть растворимый рецептор для TNF α (sTNF-R или его вариант). В дополнение к другим заболеваниям и состояниям частицы, выделяющие TNF α , могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения различных аутоиммунных заболеваний, таких как анкилозирующий спондилоартрит, болезнь Крона, гнойный гидраденит, псориаз, бляшечный псориаз, псориатический артрит, рефрактерная астма, ювенильный идиопатический артрит, язвенный колит и ревматоидный артрит. Частицы, выделяющие TNF α , также могут быть полезны для лечения или предотвращения болезни Альцгеймера, сердечно-сосудистого заболевания, диабета II типа, мышечной дистрофии и ожирения.

Биомолекулой может быть β 2-микроглобулин (B2M). Агентом может быть антитело против B2M. Частицы, выделяющие B2M, в дополнение к другим заболеваниям и состояниям могут быть полезны для лечения или предотвращения потери памяти, снижения когнитивных способностей, болезни периферических артерий, диализного амилоидоза, хронической лимфоцитарной лейкемии, множественной миеломы и лимфомы.

Биомолекулой может быть CCL2 (хемокиновый (с C-C мотивом) лиганд 2). Агентом может быть антитело против CCL2. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие CCL2, могут быть полезны для лечения или предотвращения болезни Альцгеймера, атеросклероза, ишемии (например, ишемического инсульта), эпилепсии, рассеянного склероза, псориаза, ревматоидного артрита, гломерулонефрита и травматического повреждения мозга.

Биомолекулой может быть CCL11 (хемокин 11 с C-C мотивом; эотаксин 1). Агентом может быть антитело против CCL11. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие

CCL11, могут быть полезны для лечения или предотвращения потери памяти и снижения когнитивных способностей.

Биомолекулой может быть CCL19. Агентом может быть антитело против CCL19. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие каждый CCL19, могут быть полезны для лечения или предотвращения старения и снижения когнитивных способностей.

Биомолекулой может быть интерферон гамма (INF γ). Агент может содержать антитело против INF γ , например, фонтотизумаб или растворимый рецептор INF γ (sINF γ R). Биомолекулой может быть растворимый рецептор INF γ . Агент может содержать антитело против INF γ или против sINF γ R. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие интерферон гамма, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения аутоиммунного заболевания, такого как болезнь Крона, ревматоидный артрит и псориаз.

Биомолекулой может быть кластерин (например, секреторный кластерин, изоформа 2). Агент может содержать антитело против кластерина или его антигенсвязывающий участок. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие кластерин, могут быть полезны для лечения или предотвращения рака (например, рака головы и шеи, почечноклеточного рака, колоректального рака, рака эндометрия, рака яичников, рака молочной железы, рака простаты, рака поджелудочной железы, рака легкого, печеночноклеточного рака или меланомы), заболевания почек (например, нефропатического цистиноза), синдрома Фанкони, гломерулонефрита, атеросклероза и инфаркта миокарда.

Биомолекулой может быть белок группы с высокой подвижностью (HMGB1). Агент может содержать антитело против HMGB1 или его антигенсвязывающий участок. Биомолекулой может быть белок теплового шока (например, HSP60, HSP70, HSP90). Агент может содержать антитело против HSP или его антигенсвязывающий участок. Биомолекулой может быть пероксиредоксин (например, пероксиредоксин 1 или пероксиредоксин 2). Агент может содержать антитело против пероксиредоксина или его антигенсвязывающий участок.

Агентом может быть внеклеточный участок скавенджер-рецептора, например скавенджер-рецептора класса А (например, SCARA1 (скавенджер-рецептор 1 макрофага; MSR1; CD204), SCARA2 (рецептор макрофага; MARCO), SCARA3, SCARA4 (COLEC12), SCARA5), скавенджер-рецептора класса В (например, SCARB1, SCARB2, SCARB3 (CD36)), CD68, муцин или лектиноподобный рецептор-1 окисленных ЛПНП (LOX-1).

Биомолекулой может быть инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) или белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (например, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6).

Агентом может быть инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) или белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (например, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6). Агентом может быть антитело или его антигенсвязывающий участок, который избирательно связывает инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), или белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (например, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6).

Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает внеклеточный эпитоп CD63, CD9 или CD81. Частицы, выделяющие CD63, CD9 и/или CD81, могут быть особенно полезны для утилизации внеклеточных везикул, таких как эктосома, экзосома, слущенная везикула или апоптотное тельце. Частицы, которые утилизируют различные внеклеточные везикулы, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака (например, видов рака, имеющих прогрессирование заболевания, которое коррелирует со слущиванием везикул).

Биомолекулой может быть CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL4L1, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL17, CCL1, CCL2, CCL3, CCL3L1, CCL3L3, CCL4, CCL4L1, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, XCL1, XCL2 или CX3CL1 (см., например, Zlotnik, A. and Yoshie, O. *Immunity*, 36(5):705 (2012)). Агент может содержать антитело (или его антигенсвязывающий участок), которое специфически связывает CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL4L1, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL17, CCL1, CCL2, CCL3, CCL3L1, CCL3L3, CCL4, CCL4L1, CCL4L2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, XCL1, XCL2 или CX3CL1.

Биомолекулой может быть интерлейкин 1, интерлейкин 1 альфа, интерлейкин 1 бета, интерлейкин 2, интерлейкин 3, интерлейкин 4, интерлейкин 5, интерлейкин 6, интерлейкин 7, интерлейкин 8, интерлейкин 9, интерлейкин 10, интерлейкин 11, интерлейкин 12, интерлейкин 13, интерлейкин 14, интерлейкин 15, интерлейкин 16, интерлейкин 17, интерлейкин 18, интерлейкин 19, интерлейкин 20, интерлейкин 21, интерлейкин 22, интерлейкин 23, интерлейкин 24, интерлейкин 25, интерлейкин 26, интерлейкин 27, интерлейкин 28, интерлейкин 29, интерлейкин 30, интерлейкин 31, интерлейкин 32, интерлейкин 33, интерлейкин 35 или интерлейкин 36. Агент может содержать антитело (или его антигенсвязывающий участок), которое специфически связывает интерлейкин 1, интерлейкин 1 альфа, интерлейкин 1 бета, интерлейкин 2, интерлейкин 3, интерлейкин 4, интерлейкин 5, интерлейкин 6, интерлейкин 7, интерлейкин 8,

интерлейкин 9, интерлейкин 10, интерлейкин 11, интерлейкин 12, интерлейкин 13, интерлейкин 14, интерлейкин 15, интерлейкин 16, интерлейкин 17, интерлейкин 18, интерлейкин 19, интерлейкин 20, интерлейкин 21, интерлейкин 22, интерлейкин 23, интерлейкин 24, интерлейкин 25, интерлейкин 26, интерлейкин 27, интерлейкин 28, интерлейкин 29, интерлейкин 30, интерлейкин 31, интерлейкин 32, интерлейкин 33, интерлейкин 35 или интерлейкин 36. Агент может содержать растворимый рецептор интерлейкина-2, растворимый рецептор интерлейкина-3, растворимый рецептор интерлейкина-4, растворимый рецептор интерлейкина-5, растворимый рецептор интерлейкина-6, растворимый рецептор интерлейкина-7, растворимый рецептор интерлейкина-9, растворимый рецептор интерлейкина-10, растворимый рецептор интерлейкина-11, растворимый рецептор интерлейкина-12, растворимый рецептор интерлейкина-13, растворимый рецептор интерлейкина-15, растворимый рецептор интерлейкина-20, растворимый рецептор интерлейкина-21, растворимый рецептор интерлейкина-22, растворимый рецептор интерлейкина-23, растворимый рецептор интерлейкина-27 или растворимый рецептор интерлейкина-28. Агентом может быть растворимый ST2, который связывает интерлейкин-33.

Биомолекулой может быть растворимый рецептор интерлейкина-2, растворимый рецептор интерлейкина-3, растворимый рецептор интерлейкина-4, растворимый рецептор интерлейкина-5, растворимый рецептор интерлейкина-6, растворимый рецептор интерлейкина-7, растворимый рецептор интерлейкина-9, растворимый рецептор интерлейкина-10, растворимый рецептор интерлейкина-11, растворимый рецептор интерлейкина-12, растворимый рецептор интерлейкина-13, растворимый рецептор интерлейкина-15, растворимый рецептор интерлейкина-20, растворимый рецептор интерлейкина-21, растворимый рецептор интерлейкина-22, растворимый рецептор интерлейкина-23, растворимый рецептор интерлейкина-27, или растворимый рецептор интерлейкина-28. агент может содержать антитело (или его антигенсвязывающий участок), которое специфически связывает растворимый рецептор интерлейкина-2, растворимый рецептор интерлейкина-3, растворимый рецептор интерлейкина-4, растворимый рецептор интерлейкина-5, растворимый рецептор интерлейкина-6, растворимый рецептор интерлейкина-7, растворимый рецептор интерлейкина-9, растворимый рецептор интерлейкина-10, растворимый рецептор интерлейкина-11, растворимый рецептор интерлейкина-12, растворимый рецептор интерлейкина-13, растворимый рецептор интерлейкина-15, растворимый рецептор интерлейкина-20, растворимый рецептор интерлейкина-21, растворимый рецептор интерлейкина-22, растворимый рецептор интерлейкина-23, растворимый рецептор интерлейкина-27, или растворимый рецептор интерлейкина-28. Агентом может быть интерлейкин 2, интерлейкин 3, интерлейкин 4, интерлейкин 5, интерлейкин 6, интерлейкин 7, интерлейкин 9, интерлейкин 10, интерлейкин 11, интерлейкин 12, интерлейкин 13, интерлейкин 15, интерлейкин 20, интерлейкин 21, интерлейкин 22, интерлейкин 23, интерлейкин 27, или интерлейкин 28.

Биомолекулой может быть эпинефрин, норэпинефрин, мелатонин, серотонин, триодотиронин или тироксин. Биомолекулой может быть простагландин (например, простаглицлин 12 (PGI₂), простагландин E₂ (PGE₂), простагландин F₂α (PGF₂α)), лейкотриен, простаглицлин или тромбосан. Биомолекулой может быть тестостерон, дегидроэпиандростерон (DHEA), эндростенедион, дигидротестостерон (DHT), алдостерон, эстрон, эстрадиол, эстриол, прогестерон, кортизол, кальцитриол или кальцидиол.

Биомолекулой может быть амилин, адипонектин, адреноректорикотропный гормон, ангиотензиноген, ангиотензин I, ангиотензин II, антидиуретический гормон (вазопрессин), аеплин, атриальный натрийуретический пептид, натрийуретический пептид головного мозга, кальцитонин, хемерин, холецистокинин, высвобождающий кортикотропин гормон, кортистатин, энкефалин, эндотелин, эритропоэтин, фолликулостимулирующий гормон, галанин, желудочный ингибиторный полипептид, гастрин, грелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1, высвобождающий гонадотропин гормон, высвобождающий гормон роста гормон, гепцидин, хорионический гонадотропин человека, плацентарный лактоген человека, гормон роста, ингибин, инсулин, инсулиноподобный фактор роста (соматомедин, например, IGF-I), лептин, липотропин, лютеинизирующий гормон, меланоцитостимулирующий гормон, мотилин, орексин, окситоцин, панкреатический полипептид, парашитовидный гормон, пептид, активирующий аденилатциклазу гипотиза, пролактин, высвобождающий пролактин гормон, релаксин, ренин, секретин, соматостатин, тромбозетин, тиреостимулирующий гормон (тиротропин), высвобождающий тиротропин гормон или вазоактивный интестинальный пептид. Агент может содержать антитело (или его антигенсвязывающий участок), которое специфически связывает амилин, адипонектин, адреноректорикотропный гормон, аеплин, ангиотензиноген, ангиотензин I, ангиотензин II, антидиуретический гормон (вазопрессин), атриальный натрийуретический пептид, натрийуретический пептид головного мозга, кальцитонин, хемерин, холецистокинин, высвобождающий кортикотропин гормон, кортистатин, энкефалин, эндотелин, эритропоэтин, фолликулостимулирующий гормон, галанин, желудочный ингибиторный полипептид, гастрин, грелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1, высвобождающий гонадотропин гормон, высвобождающий гормон роста, гепцидин, хорионический гонадотропин человека, плацентарный лактоген человека, гормон роста, ингибин, инсулин, инсулиноподобный фактор роста (соматомедин, например, IGF-I), лептин, липотропин, лютеинизирующий гормон, меланоцитостимулирующий гормон, мотилин, орексин, окситоцин, панкреатический полипептид, парашитовидный гормон, пептид, активирующий аденилатциклазу гипотиза, пролактин, высвобождающий пролактин гормон, релаксин, ренин, секретин, соматостатин, тромбозетин, тиреостимулирующий гормон (тиротропин), высвобождающий тиротропин гор-

мон или вазоактивный интестинальный пептид.

Биомолекулой может быть фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A). Агент может содержать антитело, которое специфически связывает VEGF-A, например, бевацизумаб или брелуцизумаб или его антигенсвязывающий участок, например, ранибизумаб. Например, агентом может быть афлиберсепт. В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, которые выделяют VEGF-A, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения макулярной дегенерации (например, влажной формы макулярной дегенерации), пролиферативной диабетической ретинопатии, неоваскулярной глаукомы, макулярного отека, рака (например, колоректального рака, рака легкого, рака простаты, рака молочной железы, рака почки, рака головного мозга), бронхиальной астмы, сахарного диабета, ишемической кардиомиопатии и ишемии миокарда.

Биомолекулой может быть растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов, например растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 (растворимый VEGFR-1), растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (растворимый VEGFR-2) или растворимый рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3 (растворимый VEGFR-3). Агентом может быть антитело или его антигенсвязывающий участок, который избирательно связывает растворимый рецептор VEGF, например, алацизумаб, икрукумаб или рамуцизумаб. Агентом может быть лиганд рецептора VEGF, например, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D или плацентарный фактор роста (PGF). В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие растворимые рецепторы VEGF, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака.

Биомолекулой может быть элемент семейства факторов роста эпидермиса, например фактор роста эпидермиса (EGF), связывающий гепарин EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), амфирегулин (AR), эпирегулин (EPR), эпиген, бетацеллюлин (BTC), нейрегулин-1 (NRG1), нейрегулин-2 (NRG2), нейрегулин-3 (NRG3) или нейрегулин-4 (NRG4). Агентом может быть антитело или его антигенсвязывающий участок, который избирательно связывает EGF, HB-EGF, TGF- α , AR, EPR, эпиген, BTC, NRG1, NRG2, NRG3 или NRG4. Агент может содержать растворимый рецептор EGF, например, растворимый рецептор EGF, растворимый HER2 или растворимый HER3. В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, выделяющие члены семейства факторов роста эпидермиса, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака.

Биомолекулой может быть растворимый рецептор фактора роста эпидермиса (рецептор EGF), например, растворимый рецептор EGF, растворимый рецептор фактора роста эпидермиса человека 2 (растворимый HER2) или растворимый рецептор фактора роста эпидермиса человека 3 (растворимый HER3). Агентом может быть антитело или его антигенсвязывающий участок, который избирательно связывает растворимый рецептор EGF, например, цетуксимаб, футуксимаб, имгатузумаб, матузумаб, нецитумумаб, нимотузумаб, панитумумаб, залутумумаб, дулиготумаб, патритумаб, эртумаксумаб, пертузумаб или трастузумаб. Агентом может быть лиганд рецептора EGF, например, член семейства EGF, как описано выше. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие растворимые рецепторы EGF, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака.

Биомолекулой может быть антитело IgE. Агент может содержать антитело против IgE, например омализумаб или тализумаб, или его антигенсвязывающий участок. Агентом может быть внеклеточный участок Fc ϵ RI. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, которые выделяют антитела IgE, могут быть особенно полезны для лечения хронической спонтанной крапивницы и аллергической астмы.

Биомолекулой может быть пропротеинконвертаза 9-го субтилизин-кексинового типа (PCSK9). Агентом может быть антитело против PCSK9, например, алирокумаб, лоделцизумаб, ралпанцизумаб или эволокумаб, или его антигенсвязывающий участок. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие PCSK9, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения гиперхолестеролемии, атеросклероза, ишемии и инфаркта миокарда.

Биомолекулой может быть аденомедуллин, нейротропный фактор мозга, эритропоэтин, фактор роста фибробластов, гепатома-производный фактор роста, глюкозо-6-фосфат изомеразы, кератиноцитарный фактор роста, фактор ингибирования миграции макрофагов, нейротропин (фактор роста нервов, нейротрофический фактор головного мозга, нейротропин-3, нейротропин-4), тромбоцитарный фактор роста, фактор стволовых клеток, тромбопоэтин, фактор роста Т-клеток, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, плацентарный фактор роста (PGF)) или реназа. Агент может содержать антитело или его антигенсвязывающий участок, который избирательно связывает аденомедуллин, нейротропный фактор мозга, эритропоэтин, фактор роста фибробластов, гепатома-производный фактор роста, глюкозо-6-фосфат изомеразу, кератиноцитарный фактор роста, фактор ингибирования миграции макрофагов, нейротропин (фактор роста нервов, нейротрофический фактор головного мозга, нейротропин-3, нейротропин-4), тромбоцитарный фактор роста, фактор стволовых клеток, тромбопоэтин, фактор роста Т-клеток, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, плацентарный фактор роста (PGF)) или реназу.

Биомолекулой может быть растворимый тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор В (раство-

римый TrkB). Агентом может быть антитело против TrkB или его антигенсвязывающий участок. Биомолекулой может быть растворимый тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор A (растворимый TrkA). Агентом может быть антитело против TrkA или его антигенсвязывающий участок. Агентом может быть нейротрофический фактор головного мозга.

Биомолекулой может быть ангиопозтин (например, ангиопозтин 1, ангиопозтин 2, ангиопозтин 3 или ангиопозтин 4) или ангиопозтиноподобный белок (например, ангиопозтиноподобный белок 1, ангиопозтиноподобный белок 2, ангиопозтиноподобный белок 3, ангиопозтиноподобный белок 4, ангиопозтиноподобный белок 5, ангиопозтиноподобный белок 6 или ангиопозтиноподобный белок 7).

Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает ангиопозтин (например, ангиопозтин 1, ангиопозтин 2, ангиопозтин 3 или ангиопозтин 4) или ангиопозтиноподобный белок (например, ангиопозтиноподобный белок 1, ангиопозтиноподобный белок 2, ангиопозтиноподобный белок 3, ангиопозтиноподобный белок 4, ангиопозтиноподобный белок 5, ангиопозтиноподобный белок 6 или ангиопозтиноподобный белок 7).

Биомолекулой может быть белок hedgehog (например, соник хеджеhog). Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает белок hedgehog. В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, выделяющие белки hedgehog, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака, например, рака поджелудочной железы, рака мозжечка и медуллобластомы.

Биомолекулой может быть растворимый человеческий лейкоцитарный белок-антиген (HLA) (например, растворимый HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, HLA-F или HLA-G (см., например, Basani-Sternberg, M. et al. Proceedings National Academy Sciences USA 107(44):18769 (2010))). Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает растворимый человеческий лейкоцитарный белок-антиген (HLA). Агентом может быть растворимый иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера. В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, которые выделяют растворимый HLA, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака.

Биомолекулой может быть растворимая изоформа UL16-связывающего белка (например, растворимый RAET1 (ULBP1; RAET1E2), растворимый RAET1H (ULBP2), растворимый RAET1N (ULBP3), растворимый RAET1E (ULBP4), растворимый RAET1G (ULBP5) или растворимый RAET1L (ULBP6)). Агентом может быть антитело, которое специфически связывает растворимую изоформу UL16-связывающего белка, или его антигенсвязывающий участок. Агентом может быть растворимый рецептор NKG2D (см., например, публикацию патентной заявки PCT № WO 2006/024367, включенная настоящим посредством ссылки во всей своей полноте).

Биомолекулой может быть растворимый MIC-A или растворимый MIC-B (см., например, Groh, V. et al. Nature 419(6908):734 (2002)).

Агентом может быть антитело против MIC-A или антитело против MIC-B или антигенсвязывающий участок каждого антитела. Агентом может быть растворимый рецептор NKG2D (см., например, публикацию патентной заявки PCT № WO 2006/024367, включенную настоящим посредством ссылки во всей своей полноте).

Агентом может быть растворимый естественный цитотоксический рецептор (см., например, Jaharian, M. et al. PloS Pathogens 7(8): e1002195 (2011)).

Биомолекулой может быть растворимый член D семейства 2 с лектиновым доменом C типа (растворимый CLEC2D; растворимый лектиноподобный транскрипт-1 (LLT1)) (см., например, Chalan, P. et al. PloS один 10(7):e0132436 (2015)). Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает растворимый LLT1. Частицы, которые выделяют растворимый LLT1, в дополнение к другим заболеваниям и состояниям могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита.

Биомолекулой может быть растворимый CD16 (см., например, Hoover, R.G. J Clinical Investigation 95:241 (1995)). Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает растворимый CD16. В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, которые выделяют растворимый CD16, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения рака.

Биомолекулой может быть ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-2), тканевой активатор плазминогена, урокиназа, плазминоген, тромбин или α 2-макрोगлобулин. Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1), ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-2), тканевой активатор плазминогена, урокиназу, плазминоген, тромбин или α 2-макрोगлобулин.

Биомолекулой может быть фактор XII, фактор XIIa, фактор XI, фактор XIa, фактор IX, фактор IXa, фактор X, фактор Xa, фактор VII, фактор VIIa, фактор XIII, фактор XIIIa, фактор V, протромбин, тромбин, фактор фон Виллебранда, тромбосан A2, фибриноген или фибрин. Агентом может быть антитело, которое избирательно связывает фактор XII, фактор XIIa, фактор XI, фактор XIa, фактор IX, фактор IXa, фактор X, фактор Xa, фактор VII, фактор VIIa, фактор XIII, фактор XIIIa, фактор V, протромбин, тромбин, фактор фон Виллебранда, тромбосан A2, фибриноген или фибрин.

Биомолекулой может быть серпин (например, α 1-антитрипсин, антитрипсин-родственный белок,

α 1-антихимотрипсин, каллистатин, ингибитор белка C, транскортин, связывающий тироксин глобулин, ангиотензиноген, центерин (GCET1), ингибитор родственной белку Z протеазы, васпин, антитромбин, гепарин кофактор II, ингибитор активатора плазминогена 1, глиальный нексин (протеолитический нексин I), фактор пигментного эпителия, α 2-антиплазмин, ингибитор комплемента 1, нейросерпин, ингибитор активатора плазминогена, 2SERPINA1 или SERPINA2). Агент может содержать антитело, которое избирательно связывает серпин или его антигенсвязывающий участок.

Биомолекулой может быть растворимый ST2. Агентом может быть интерлейкин-33 или антитело, которое специфически связывает растворимый ST2 (или его фрагмент). В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, которые выделяют растворимый ST2, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения заболевания сердца, инфаркта миокарда, острого коронарного синдрома и сердечной недостаточности.

Биомолекулой может быть миостатин (фактор роста и дифференцировки 8 (GDF-8)). Агентом может быть антитело против миостатина, например, стаумумаб или тревогрумаб. Агентом может быть рецептор активина или его связывающий миостатин участок, например, агентом может быть растворимый рецептор активина типа IIB. В дополнение к другим состояниям и заболеваниям, частицы, выделяющие миостатин, могут быть особенно полезны для лечения мышечной дистрофии, кахексии, саркопении и различных форм дистрофии мышечной ткани (например, дистрофия мышечной ткани вследствие невосполнения).

Биомолекулой может быть грелин. Агентом может быть антитело против грелина. Частицы, выделяющие грелин, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения ожирения, синдрома Прадера-Вилли, зависимости, алкоголизма и резистентности к лептину (например, генетической резистентности к лептину).

Биомолекулой может быть sLR11 (растворимый SORL1; растворимый SORLA; растворимый SORLA1). Агентом может быть антитело против sLR11. Частицы, выделяющие sLR11, в дополнение к другим заболеваниям и состояниям могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения ожирения.

Биомолекулой может быть TGF- β (трансформирующий фактор роста бета, например, TGF- β 1, TGF- β 2 или TGF- β 3). Агентом может быть антитело против TGF- β , например, фрезолумаб, лерделиумаб или метелиумаб. агент может содержать домен связывания TGF- β рецептора TGF- β . Агентом может быть LTBP₁ (бета-связывающий белок латентного трансформирующего фактора роста 1), 14-3-3-белок эпсилон (тирозин 3-монооксигеназа/триптофан 5-монооксигеназа активации белок, эпсилон; YWHAЕ) или субъединица I фактора инициации трансляции у эукариот 3 (EIF3I), каждый из которых связывает TGF- β . В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие TGF- β , могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения склеродермии, идиопатического легочного фиброза, заболевания почек, фокально-сегментарного гломерулосклероза, кератоконуса, синдрома Марфана, болезни Альцгеймера, снижения когнитивных способностей, травматического повреждения мозга, мышечной атрофии и рака (например, рака почки и меланомы).

Биомолекулой может быть Wnt (например, Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11 или Wnt16). Агентом может быть антитело против Wnt. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие Wnt, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения ожирения, диабета II типа, атеросклероза, кальцифицированного стеноза аортального клапана, острого коронарного синдрома, сердечной недостаточности, инсульта и рака (например, рака молочной железы, колоректального рака, рака пищевода, меланомы, рака простаты, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, саркомы, глиобластомы или рака яичников).

Биомолекулой может быть растворимый лиганд Notch (например, растворимый Jagged1, растворимый Jagged2, растворимый дельтаподобный лиганд 1 (DLL1), растворимый дельтаподобный лиганд 3 (DLL3) и дельтаподобный лиганд 4 (DLL4)). Агентом может быть антитело против лиганда Notch, например, демцизумаб или энотикумаб, или растворимый рецептор Notch (например, растворимый NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 или NOTCH4) или его вариант. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие растворимые лиганды Notch, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения атеросклероза, кальцифицированного стеноза аортального клапана, острого коронарного синдрома, сердечной недостаточности, инсульта и рака (например, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, почечноклеточной карциномы, немелкоклеточного рака легкого и солидных опухолей).

Биомолекулой может быть растворимый рецептор Notch (например, растворимый NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 или NOTCH4). Агентом может быть антитело против рецептора Notch, например, тарекстумаб или бронтиткузумаб или растворимый лиганд Notch. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие растворимые рецепторы Notch, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения атеросклероза, кальцифицированного стеноза аортального клапана, острого коронарного синдрома, сердечной недостаточности, инсульта и рака (например, рака молочной железы,

рака поджелудочной железы, почечноклеточной карциномы, немелкоклеточного рака легкого и солидных опухолей).

Мишенью может быть гидроксипатит или кальций (например, кристаллический кальций). Агентом может быть хелатирующий агент, например, этилендиамин тетрауксусная кислота (EDTA), диэтилен триамин пентауксусная кислота (ДТРА), натрия тиосульфат (STS), инозитола гексафосфат или лимонная кислота. В дополнение к другим заболеваниям и состояниям, частицы, выделяющие гидроксипатит или кальций, могут быть особенно полезны для лечения или предотвращения атеросклероза, кальцифицированного стеноза аортального клапана и кальцифицированного тендинита.

В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой аутоантитело. Аутоантитело представляет собой антитело, продуцируемое больным, которое специфически связывает антиген, продуцируемый больным. Аутоантитела связаны со многими разными болезненными состояниями, включая волчанку. Кроме того, индуцирование новых аутоантител может быть связано с терапевтическим воздействием, например, которое приводит к лекарственной волчанке. Таким образом, композиция, содержащая множество частиц, содержащих агент, который избирательно связывает одно или более аутоантител, может использоваться, например, в способе лечения или предотвращения волчанки (например, лекарственной волчанки). Биомолекулой может быть, например, аутоантитело с двухспиральной ДНК или антиядерное аутоантитело.

Частица, которая выделяет аутоантитело, может содержать агент, которым является антиген аутоантитела.

Биомолекулой может быть аутоантитело против β -адренорецептора или аутоантитело против M2-мускаринового рецептора, например, для предотвращения или лечения идиопатической дилатационной кардиомиопатии. В частности, частица, которая выделяет аутоантитело против β адренорецептора или аутоантитело против M2-мускаринового рецептора, может быть введена больному с болезнью Шагаса, которая коррелирует с индукцией таких аутоантител (см., например, Herda, L.R. et al. Br J Pharmacol 166(3):847 (2012)). Биомолекулой может быть аутоантитело против альфа-1-адренергического рецептора, например, для лечения или предотвращения гипертензии (см., например, Luther, H.P. et al. Hypertension 29(2):678 (1997)). Биомолекулой может быть аутоантитело против рецептора мускаринового типа 3, например, для применения для лечения или предотвращения синдрома Шегрена (см., например, Lee, B.H. et al. PloS One 8(1):e53113 (2013)).

Аутоантитела против гормонов и цитокинов могут буферизировать концентрацию гормонов и цитокинов, например, путем обратимого связывания с ними для регулирования концентрации свободных, активных разновидностей. Отклонения от здоровых уровней аутоантител могут вносить вклад в возникновение заболеваний в результате потери цитокинового или гормонального гомеостаза. Например, аутоантитела против IFN γ могут индуцировать диссеминированные нетуберкулезные микобактериальные инфекции, аутоантитела против IL-17 ассоциированы с развитием хронического кандидоза слизистых, а аутоантитела против IL-6 ассоциированы с тяжелыми стафилококковыми или стрептококковыми инфекциями. Аутоантитела к гормону голода грелину могут опосредовать эффективную концентрацию грелина, доступного для связывания с рецептором грелина GHSR1.

В некоторых вариантах осуществления биомолекула представляет собой аутоантитело. Например, аутоантитело может быть против IFN γ , против IL-17, против IL-6 или аутоантителом против грелина. В некоторых вариантах осуществления агентом является естественный лиганд аутоантитела (например, антиген, выделяемый аутоантителом). Например, агентом может быть IFN γ , IL-17, IL-6 или грелин. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения пациента с заболеванием дисрегуляции цитокина, например, аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения пациента с нарушением обмена веществ, например, ожирением.

В моделях кахексии связывание активина с рецептором активина IIb типа ActRIIb приводит к мышечной атрофии. Избыточные уровни активина в сыворотке связаны с мышечной атрофией и фиброзом в моделях кахексии, которая может быть обратима посредством антител, которые блокируют передачу сигналов активина A и B/ActRIIb, и повышенный уровень активина обнаружен в сыворотке раковых пациентов. Саркопения представляет собой прогрессирующее состояние потери мышечной массы при старении, а также связана с передачей сигналов избыточного активина. Таким образом, биомолекулой может быть активин (например, активин A или активин B). Агентом может быть естественный лиганд для активина, такой как рецепторный белок активина, например, ActRIIb или его вариант, или антитело против активина. Агентом может быть миостатин. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения пациента с заболеванием мышечной атрофией, например, кахексией или саркопенией.

Специалисту также должно быть понятно, что частицы, описанные в данном документе, также полезны для утилизации более широкого множества мишеней, биологическая активность которых может быть, например, нежелательна. Например, можно сконструировать частицы для связывания с компонентами капсида или оболочек вирусов для изоляции посредством этого вируса от крови больного. В неко-

торых вариантах осуществления могут быть сконструированы частицы для связывания и изолирования токсинов (например, бактериальных токсинов, растительных токсинов и зоотоксинов, таких как один или более компонентов змеинового яда) в кровотоке больного. В некоторых вариантах осуществления можно сконструировать частицы для связывания и изолирования микромолекул (например, психоактивных лекарственных средств или микромолекулярных токсинов) из кровотока больного. В таких вариантах осуществления частицы могут быть полезны для выведения токсинов из организма, например, после укуса змеи или насекомого. В некоторых вариантах осуществления частицы могут использоваться для лечения, предотвращения, замедления наступления или уменьшения тяжести анафилактического шока у больного (например, посредством утилизации антигена, вызывающего анафилактический иммунный ответ).

В некоторых вариантах осуществления мишень ассоциирована с вирусом, например, с вирусным структурным белком (например, с белком капсида вируса или оболочки вируса), который связывается агентом. В таких вариантах осуществления частицы используются в качестве противовирусных видов терапии, например, для больного, инфицированного вирусом, или с риском инфицирования вирусом. Вирус может представлять собой оболочечный вирус или необолочечный вирус.

В некоторых вариантах осуществления растворимая биомолекула является микромолекулой или макромолекулой. В некоторых вариантах осуществления самое длинное измерение растворимой биомолекулы не больше чем 600 нм (например, меньше чем 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 или 25 нм). Например, биомолекула может иметь радиус молекулы от приблизительно 1 Å до приблизительно 1 мкм, например, от приблизительно 1 Å до приблизительно 100 нм, от приблизительно 1 Å до приблизительно 20 нм, от приблизительно 1 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 1 нм до приблизительно 100 нм или от приблизительно 1 нм до приблизительно 20 нм. Биомолекула может иметь молекулярную массу от приблизительно 3 а.е.м. до приблизительно 10^7 а.е.м. Например, от приблизительно 100 а.е.м. до приблизительно 10^7 а.е.м., от приблизительно 3 а.е.м. до приблизительно 10^6 а.е.м., от приблизительно 3 а.е.м. до приблизительно 10^5 а.е.м., от приблизительно 100 а.е.м. до приблизительно 10^6 а.е.м. или от приблизительно 400 а.е.м. до приблизительно 10^6 а.е.м. Биомолекула может иметь молекулярную массу от приблизительно 10^5 а.е.м. до приблизительно 10^7 а.е.м.

Термины "специфическое связывание", "специфически связывает", "избирательное связывание", "избирательно связывает" и аналогичные грамматические термины, как использовано в данном документе, относятся к двум молекулам, образующим комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Обычно связывание считается специфическим, когда константа (k_a) ассоциации выше чем $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Таким образом, первый элемент пары специфического связывания может специфически связывать второй элемент пары связывания с k_a по меньшей мере (или больше чем) $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (например, по меньшей мере или больше чем 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или $10^{15} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше). В некоторых вариантах осуществления селективное взаимодействие имеет константу (k_d) диссоциации меньше или равную 10^{-3} s^{-1} (например, 8×10^{-4} , 5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 10^{-4} или 10^{-5} s^{-1}).

Специфическое связывание не относится к взаимодействию, которое обусловлено главным образом неспецифическим электростатическим взаимодействием или неспецифическим гидрофобным взаимодействием, которые могут иметь подходящую константу ассоциации. Например, нуклеиновые кислоты, которые имеют отрицательный заряд, могут связываться с катионной частицей с подходящей константой ассоциации, независимо от специфического взаимодействия, и по определению в данном документе такое связывание не является "специфическим связыванием". Аналогично, липид может связывать гидрофобную частицу с подходящей константой ассоциации, независимо от специфического взаимодействия, и по определению в данном документе такое связывание не является "специфическим связыванием".

В некоторых вариантах осуществления биомолекула и частица имеют одинаковый заряд при физиологическом pH (~7,4). Например, биомолекула может иметь отрицательный заряд и частица может иметь отрицательный заряд или биомолекула может иметь положительный заряд и частица может иметь положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления биомолекула и частица имеют противоположные заряды при физиологическом pH. Например, биомолекула может иметь положительный заряд, а частица может иметь отрицательный заряд, или биомолекула может иметь отрицательный заряд, а частица может иметь положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления биомолекула при физиологическом pH имеет нейтральный заряд, и/или частица при физиологическом pH имеет нейтральный заряд.

Биомолекула может иметь изоэлектрическую точку от приблизительно 0 до приблизительно 14. Нуклеиновые кислоты имеют изоэлектрическую точку от приблизительно 4 до приблизительно 7, и, таким образом, биомолекула может иметь изоэлектрическую точку от приблизительно 4 до приблизительно 7. белки обычно имеют изоэлектрическую точку от приблизительно 4 до приблизительно 10, и, таким образом, биомолекула может иметь изоэлектрическую точку от приблизительно 4 до приблизительно 10. Тем не менее, немодифицированные пептиды и белки могут иметь изоэлектрические точки, варьирующие от приблизительно 2,5 (на основании результатов аспартата; pI~2,8) до приблизительно 11 (на основании результатов аргинина; pI~11), хотя известны белки с изоэлектрическими точками, выходящими за пределы этого диапазона. Соответственно, биомолекула может иметь изоэлектрическую точку, варьи-

рующую от приблизительно 2,5 до приблизительно 11. Секреторные белки и растворимый, внеклеточные участки мембранных белков при физиологическом pH обычно имеют небольшой отрицательный заряд, и, таким образом, биомолекула может иметь изоэлектрическую точку от приблизительно 4 до приблизительно 7, например, от приблизительно 4 до приблизительно 6. Биомолекула может иметь изоэлектрическую точку от приблизительно 0 до приблизительно 4, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 4 до приблизительно 8, от приблизительно 6 до приблизительно 10, от приблизительно 8 до приблизительно 12 или от приблизительно 10 до приблизительно 14. Биомолекула может иметь изоэлектрическую точку от приблизительно 0 до приблизительно 2, от приблизительно 1 до приблизительно 3, от приблизительно 2 до приблизительно 4, от приблизительно 3 до приблизительно 5, от приблизительно 4 до приблизительно 6, от приблизительно 4 до приблизительно 6, от приблизительно 5 до приблизительно 7, от приблизительно 6 до приблизительно 8, от приблизительно 7 до приблизительно 9, от приблизительно 8 до приблизительно 10, от приблизительно 9 до приблизительно 11, от приблизительно 10 до приблизительно 12, от приблизительно 11 до приблизительно 13 или от приблизительно 12 до приблизительно 14.

В некоторых вариантах осуществления селективное взаимодействие имеет K_D менее чем 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} М. Константа K_D равновесия представляет собой отношение кинетических констант скорости - k_d/k_a . В некоторых вариантах осуществления селективное взаимодействие имеет K_D менее чем 1×10^{-9} М.

Как использовано в данном документе, термин "взаимодействие", при ссылке на взаимодействие между двумя молекулами, относится к физическому контакту (например, связыванию) молекул друг с другом. Обычно, такое взаимодействие приводит к активности (которая производит биологическое действие) одной, либо обеих указанных молекул. Ингибирование такого взаимодействия приводит к нарушению активности одной или более молекул, вовлеченных во взаимодействие.

Как использовано в данном документе, термин "ингибирование" и его грамматические эквиваленты относятся к уменьшению, ограничению и/или блокированию конкретного действия, функции или взаимодействия. В одном варианте осуществления термин относится к уменьшению уровня заданного результата или параметра до величины (например, естественного уровня взаимодействия между двумя элементами пары специфического связывания), которая составляет по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99% или меньше чем величина соответствующего контроля. Пониженный уровень заданного результата или параметра не обязательно, хотя и может, означает абсолютное отсутствие результата или параметра. Изобретение не требует и не ограничено способами, которые полностью устраняют результат или параметр. Существенное ингибирование может составлять, например, по меньшей мере 50% (например, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% или более) ингибирования взаимодействия между двумя биомолекулами (например, первым и вторым элементами пары связывания).

В данной области известны способы обнаружения взаимодействия или измерения аффинности одной биомолекулы для другой. Например, связывание двух биомолекул можно обнаружить и/или количественно определить, используя множество методик, например, но без ограничения, интерферометрию биослоев (BLI), вестерн-блоттинг, дотблоттинг, метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR), фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), анализы AlphaScreen® или AlphaLISA® или методы на основе масс-спектропии.

В некоторых вариантах осуществления связывание можно анализировать, используя любые анализы на основе SPR, известные в данной области, для получения характеристик кинетических параметров взаимодействия двух биомолекул. В способах, описанных в данном документе, может использоваться любой коммерчески доступный инструмент SPR, включая, но без ограничения, инструменты BIAcore (Biacore AB; Uppsala, Sweden); инструменты IAsys (Affinity Sensors; Franklin, Massachusetts); систему IBIS (Windsor Научные Limited; Berks, UK), системы SPR-CELLIA (Nippon Laser and Electronics Lab; Hokkaido, Japan) и SPR Detector Spreeta (Texas Instruments; Dallas, Texas) (см., например, Mullett et al. *Methods* 22:77-91(2000); Dong et al. *Reviews in Mol Biotech* 82:303-323(2002); Fivash et al. *Curr Opin Biotechnol* 9:97-101(1998) и Rich et al. *Curr Opin Biotechnol* 11:54-61 (2000)).

В некоторых вариантах осуществления биомолекулярные взаимодействия между двумя биомолекулами можно анализировать, используя BLI на Octet (ForteBio Inc.). BLI представляет собой не содержащий меток оптический аналитический метод, который определяет связывание между лигандом, который иммобилизован на кончике биосенсора, и анализируемым веществом в растворе путем измерения в реальном времени изменения толщины слоя белка на кончике биосенсора.

В некоторых вариантах осуществления для получения характеристики связывания двух биомолекул можно использовать анализы AlphaScreen (PerkinElmer). Акроним ALPHA означает гомогенный анализ усиления люминисценции при сближении. AlphaScreen представляет собой основанный на гранулах анализ при сближении, который определяет связывание между молекулами, соединенными с донорными и акцепторными гранулами, путем измерения сигнала, возникающего за счет передачи энергии между донорными и акцепторными гранулами (см., например, Eglen et al. *Curr Chem Genomics* 1:2-10(2008)).

В некоторых вариантах осуществления для получения характеристики связывания двух биомолекул можно использовать анализы AlphaLISA® (PerkinElmer). AlphaLISA представляет собой модифицированный анализ AlphaScreen, описанный выше, с включением содержащих европий акцепторных гранул, который функционирует в качестве альтернативы традиционным анализам ELISA (см., например, Eglen et al. *Curr Chem Genomics* 1:2-10 (2008)).

Можно использовать множество методик иммуноанализа, включая конкурентный и неконкурентный иммуноанализы. Термин "иммуноанализ" охватывает методики, включая, без ограничения, проточную цитометрию, FACS, ферментные иммуноанализы (EIA), например, метод иммуноанализа с ферментативным усилением (EMIT), фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), ELISA с захватом IgM антител (MAC ELISA) и иммуоферментный анализ на микрочастицах (MEIA), кроме того, иммуноанализы с капиллярным электрофорезом (CEIA), радиоиммуноанализы (RIA), иммунорадиометрические анализы (IRMA), флуоресцентные поляризационные иммуноанализы (FPIA) и хемилюминесцентные анализы (CL). При необходимости такие иммуноанализы могут быть автоматическими. Также иммуноанализы можно использовать в сочетании с лазерноиндуцированной флуоресценцией. Для применения в настоящем изобретении также подходят липосомальные иммуноанализы, например, проточно-инжекционные липосомальные иммуноанализы и липосомальные иммуносенсоры. В дополнение, для применения в способах настоящего изобретения подходят нефелометрические анализы, в которых, например, образование биомолекулярных комплексов приводит к повышенному рассеянию света, которое в качестве функции концентрации маркера преобразуется в сигнал максимальной интенсивности. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в ELISA, RIA, флуоресцентном иммуноанализе (FIA) или иммунологическом анализе растворимых частиц (SPIA) обнаруживают продукты инкубации.

В некоторых вариантах осуществления связывание двух биомолекул можно проанализировать, используя методы термической денатурации, включая дифференциальную сканирующую флуориметрию (DSF) и дифференциальное статическое рассеяние света (DSLС).

В некоторых вариантах осуществления связывание двух биомолекул можно проанализировать, используя метод на основе масс-спектропии, например, но без ограничения, платформу для масс-спектропии с выбором аффинности (AS-MS). Это не содержащий меток метод, в котором инкубируют белок и тестируемое соединение, промывают несвязанные молекулы и анализируют комплексы белок-лиганд с помощью MS для идентификации лиганда после стадии декомплексации.

В некоторых вариантах осуществления связывание двух биомолекул можно количественно определить, используя, например, поддающиеся обнаружению меченые белки, например, радиомеченую (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченую (например, FITC) или меченую с помощью ферментов биомолекулу, путем иммуноанализа или путем хроматографического обнаружения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено использование флуоресцентных поляризационных анализов и анализов с резонансным переносом энергии флуоресценции (FRET) при либо прямом, либо опосредованном измерении степени взаимодействия между двумя биомолекулами.

II. Частицы.

Как использовано в данном документе, термин "частица" относится к небольшой массе, которая может включать любой материал, такой как оксид алюминия, металл (например, золото или платина), стекло, кремнезем, латекс, пластмасса, агароза, полиакриламид, метакрилат или любой полимерный материал, и иметь любой размер и форму. В некоторых вариантах осуществления частица или частицы содержат кремний (см., например, публикацию международной патентной заявки №№ WO 2013/011764, WO 2013/029278 и WO 2014/151381, и публикацию патентной заявки США № 2014/0271886, раскрытия каждой из которых включены посредством ссылки во всей полноте). В некоторых вариантах осуществления частицы содержат или состоят из крахмала (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 2010/084088). В некоторых вариантах осуществления частица или частицы состоят из нуклеиновой кислоты (например, существующей в природе или не существующей в природе нуклеиновой кислоты). Способы получения таких основанных на нуклеиновых кислотах микроскопических структур известны в данной области и описаны, например, у Douglas et al. *Nucl Acids Res* 37 (15):5001-5006 (2009); Douglas et al. *Nature* 459 (7245):414-428 (2009); Voigt et al. *Nat Nanotechnol* 5(3):200-203 (2010) и Endo et al. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem Chapter 12*(Unit 12.8) (2011).

В предпочтительных вариантах осуществления частица нерастворима в водном растворе (например, частица может быть нерастворима в воде, сыворотке крови, плазме крови, внеклеточной жидкости и/или интерстициальной жидкости). Например, частица может быть отделена от водного раствора посредством центрифугирования раствора, содержащего частицу, например, со скоростью, которая достаточна для отделения клеток суспензии клеток от водного раствора суспензии клеток. Тем не менее, частица может легко существовать в виде суспензии в водном растворе, например, мягкое встряхивание или вихревое перемешивание из множества частиц в водном растворе является достаточным для суспендирования частиц в растворе. В некоторых вариантах осуществления частица не представляет собой гидрогель. В некоторых вариантах осуществления частица не содержит гидрогель. В некоторых вариантах осуществления

частица не содержит полимер.

Предпочтительно частица является достаточно большой для связывания более чем с одной биомолекулой и ингибирования взаимодействия более чем одной связанной биомолекулы с партнером по связыванию. Например, частица может быть от приблизительно 50 нм до приблизительно 10 мкм. Частица может иметь размер от 1 до 5 мкм, от 1,2 до 4 мкм, от 1,5 до 4 мкм или от 2 до 4 мкм.

Частицы с размерами меньше чем 300 нм, например меньше чем 200 нм или меньше чем 150 нм, предпочтительны для вариантов применения, в которых частицы предназначены для ввода и/или вывода из сосудистой сети больного, например, частицы, которые можно вводить путем подкожной инъекции. Тем не менее, более крупные частицы также хорошо подходят для подкожной инъекции для способов, в которых частицы не предназначены для ввода в сосудистую сеть. Частицы с размерами от приблизительно 1 мкм до приблизительно 5 мкм предпочтительны для вариантов применения, в которых частицы предназначены для циркуляции внутри сосудистой сети больного, например, после внутривенного введения. Частицы с размерами больше чем 5 мкм могут быть предпочтительны для вариантов применения, в которых частицы предназначены для нахождения на участке, в котором их имплантируют, например, внутри или рядом с опухолью; однако, частицы меньше чем 5 мкм также могут подходить для имплантации. Для вариантов применения *in vitro* можно использовать частицы любого размера.

Также в данном документе представлены наборы частиц. В некоторых вариантах осуществления множество частиц имеет узкую или широкую полидисперсность. Как использовано в данном документе, "полидисперсность" относится к диапазону размеров частиц внутри конкретной совокупности частиц. То есть чрезвычайно полидисперсная совокупность может включать частицы, имеющие средний размер, например, 1 мкм, с отдельными частицами, варьирующими от 0,1 до 4 мкм. В некоторых вариантах осуществления предпочтительной является "узкая полидисперсность". То есть, учитывая конкретный средний размер частиц, сейчас предпочтительно, чтобы отдельные частицы в совокупности отличались не более чем на $\pm 20\%$, предпочтительно не более чем на $\pm 15\%$, а наиболее предпочтительно теперь не более чем на $\pm 10\%$ от среднего размера частиц. Более конкретно, совокупность частиц предпочтительно имеет средний размер частиц от приблизительно 0,5 до приблизительно 2 мкм, более предпочтительно теперь от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,5 мкм. Таким образом, если выбран средний размер частиц 1 мкм, отдельные частицы в совокупности наиболее предпочтительно будут внутри диапазона от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления совокупность частиц имеет средний размер частиц от приблизительно 0,3 до приблизительно 1 мкм, например, от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,9, от приблизительно 0,5 до приблизительно 0,9, от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,8, от приблизительно 0,5 до приблизительно 0,7, от приблизительно 0,3 до приблизительно 0,9 или от приблизительно 0,3 до приблизительно 0,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления совокупность частиц имеет средний размер частиц от приблизительно 1 мкм до приблизительно 10 мкм, например, от приблизительно 1,1 мкм до приблизительно 4,8, от приблизительно 1,2 мкм до приблизительно 4,6, от приблизительно 1,4 мкм до приблизительно 4,4, от приблизительно 1,6 мкм до приблизительно 4,2, от приблизительно 1,8 мкм до приблизительно 4,0 или от приблизительно 2,0 мкм до приблизительно 3,8 мкм.

В некоторых вариантах осуществления в раскрытии представлен набор или множество частиц, имеющих определенный средний размер частиц. Как использовано в данном документе, "средний размер частиц" получают путем измерения размера отдельных частиц, а затем деления на общее число частиц. Определение среднего размера частиц хорошо известно в данной области. Обычно самый длинный средний размер частиц составляет не больше чем 4 мкм. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц составляет не больше чем 3,9 (например, не больше чем 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1) мкм. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц составляет не больше чем 2,5, 2, 1,5 или 1,25 мкм. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц составляет по меньшей мере 1 мкм, но не больше чем 4 мкм. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц составляет по меньшей мере 1 мкм, но не больше чем 2 мкм. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц составляет по меньшей мере 1 мкм, но не больше чем 1,5 мкм. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц составляет по меньшей мере 0,5 мкм (например, по меньшей мере 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 мкм), но не больше чем 4 мкм (например, не больше чем 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7 или 1,6 мкм).

В некоторых вариантах осуществления частицы представляют собой наночастицы. В некоторых вариантах осуществления самый длинный средний размер частиц не больше чем 900 нм (например, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200 или 150 нм). В некоторых вариантах осуществления частица имеет форму и размер для циркуляции в крови или сосудистой сети (например, в артериях, венах и капиллярах) больного (например, больного человека). Иллюстративные конструкции частиц изложены на фиг. 1-6.

В некоторых вариантах осуществления самый длинный размер частицы составляет от приблизи-

тельно 50 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 100 нм до приблизительно 4,5 мкм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 300 нм до приблизительно 3,5 мкм, от приблизительно 300 нм до приблизительно мкм или от приблизительно 400 нм до приблизительно 3 мкм. В некоторых вариантах осуществления самый короткий размер частицы составляет по меньшей мере приблизительно 300 нм, например от приблизительно 300 нм до приблизительно 4 мкм или от приблизительно 400 нм до приблизительно 3 мкм.

В некоторых вариантах осуществления множество частиц являются многогранными, например, кубическими. В некоторых вариантах осуществления множество частиц являются сферическими. В некоторых вариантах осуществления любая частица, описанная в данном документе, может быть пористой. Такие пористые частицы содержат внешнюю поверхность и внутренние поверхности пор частицы. Агент может быть, например, иммобилизован на внутренних поверхностях. В некоторых вариантах осуществления множество пор имеют размер в поперечном разрезе по меньшей мере 50 нм. В некоторых вариантах осуществления множество пор имеют размер в поперечном разрезе по меньшей мере 100 нм. Пористые наночастицы были описаны, например, в публикации патентных заявок США №№ 20140199352, 20080277346 и 20040105821, раскрытия каждой из которых включены посредством ссылки во всей полноте. Сферические частицы описаны, например, в патенте США № 8778830 и 8586096, каждый из которых включен настоящим посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления сферические частицы могут дополнительно содержать два пересекающихся ребра, продолжающихся от сферической поверхности частицы, при этом самое длинное ребро каждой из структур составляет не больше чем 4 мкм (например, не больше чем 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкм), и при этом ребра имеют размер и ориентированы: (i), чтобы ингибировать связывание или активацию агентом, иммобилизованным на поверхности сферической частицы, рецепторного белка клеточной поверхности и/или (ii) когда растворимая биомолекула связана с агентом, чтобы ингибировать взаимодействие растворимой биомолекулы и второго элемента пары специфического связывания, в которой растворимая биомолекула представляет собой первый элемент.

В некоторых вариантах осуществления множество частиц являются тороидальными. В таких вариантах осуществления агент может быть иммобилизован на внутренней периферической поверхности частицы (например, вокруг отверстия - см. фиг. 2). В некоторых вариантах осуществления диаметр частицы составляет не больше чем 4 мкм (например, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкм). В некоторых вариантах осуществления диаметр частицы составляет не больше чем 900 нм (например, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 200 или 150 нм).

В некоторых вариантах осуществления частицы, описанные в данном документе, являются дендритными. Такие частицы описаны, например, у Du et al. Small 11(4):392-413 (2015); Siegwart, D.J. et al. Proceedings National Academy Sciences USA 108(32):12996 (2011); в патентах США №№ 5814272 и 7932311 и в публикации патентной заявки США № 20040166166, раскрытия каждой из которых включены настоящим в данный документ посредством ссылки. Как описано ниже, в некоторых вариантах осуществления геометрия дендритных частиц такова, что агент, иммобилизованный на внутренней поверхности частицы, имеет пониженную или существенно пониженную способность взаимодействовать с биомолекулой на поверхности клетки, и/или растворимая биомолекула, связанная с частицей посредством агента, имеет пониженную или существенно пониженную способность взаимодействовать со своим когнатным лигандом (вторым элементом пары специфического связывания).

В некоторых вариантах осуществления множество частиц являются многогранными, например, восьмигранными или двадцатигранными (см., например, фиг. 3), будь они правильными или неправильными. Частицы могут содержать по меньшей мере один выступ по меньшей мере из одной из своих вершин (см., например, фиг. 3). Частицы могут содержать более чем один (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или более) выступов из своих вершин. Такие выступы, например, могут иметь размер и/или быть ориентированы: (i) чтобы ингибировать связывание или активацию агентом, иммобилизованным на поверхности сферической частицы, рецепторного белка клеточной поверхности и/или (ii) когда растворимая биомолекула связана с агентом, чтобы ингибировать взаимодействие растворимой биомолекулы и второго элемента пары специфического связывания, в которой растворимая биомолекула представляет собой первый элемент.

Частица может содержать пустое пространство, называемое в данном документе "пустота" или "пустоты". Пустота представляет собой пространство в частице, которое заполнено текучей средой (например, жидкостью, которая может содержать биомолекулу, или газом, например, когда частица сухая) или представляет собой пустое пространство (например, при этом частица находится в вакууме, например, после лиофилизации). Объем пустот частицы может включать, например, объем пор частицы и/или объем внутренней части полости частицы ядро-оболочка, просвет трубки, валик или кольцо.

В некоторых вариантах осуществления частица выполнена так, что плазма крови может свободно входить и/или выходить из пустого пространства частицы, например, при этом частица расположена в сосудистой сети больного. В некоторых вариантах осуществления частица выполнена так, что сыворотка

Объем пустого пространства в частице предпочтительно достаточно большой для размещения более чем одной биомолекулы, например, общий объем пустот частицы предпочтительно достаточно большой для размещения каждой биомолекулы, которая связана с частицей. Тем не менее, пустота может быть меньше, чем общий объем каждой связанной биомолекулы при условии, что частица способна ингибировать взаимодействия между каждой связанной биомолекулой и вторыми элементами пар связывания, которые включают каждую биомолекулу. Например, чтобы ингибировать взаимодействия между биомолекулой и вторым элементом пары связывания, может быть нужно, чтобы частица изолировала только участок связывания биомолекулы, и такая частица может содержать объем пустот, который вмещает участок связывания каждой биомолекулы, но который позволяет другим участкам одной или более биомолекул выступать из пустого пространства наружу.

В некоторых вариантах осуществления частица может содержать от приблизительно 5% до приблизительно 95% пустого пространства. Частица, содержащая выступы, может содержать небольшое пустое пространство или вовсе его не иметь, например, вследствие того, что выступы могут ингибировать взаимодействия между связанными биомолекулами и вторым элементом пары связывания. Частица, содержащая трубку, может содержать пустое пространство большой величины, например, вследствие того, что трубка может содержать большой внутренний объем относительно толщины стенок трубки. Тем не менее, объем пустот частиц с аналогичной геометрией может содержать объем пустот изменяющейся величины, например, трубки, содержащие стенки одинаковой толщины, могут существенно варьировать по процентному объему пустоты в зависимости от диаметра трубки.

[illegible]

Частица может содержать нейтральный заряд при физиологическом pH (например, ~7,4). Частица может содержать небольшой отрицательный или небольшой положительный заряд при физиологическом pH. Поверхность частицы (например, внешняя поверхность) может содержать небольшой отрицательный или небольшой положительный заряд при физиологическом pH. В предпочтительных вариантах осуше-

ствления поверхность частицы (например, внешняя поверхность) содержит небольшой отрицательный или нейтральный заряд при физиологическом pH. Изoeлектрическая точка частицы может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 9, предпочтительно от приблизительно 6 до приблизительно 8. Частицы, содержащие нуклеиновую кислоту, могут иметь изoeлектрическую точку от приблизительно 4 до приблизительно 7. В некоторых вариантах осуществления изoeлектрическая точка частицы составляет меньше чем 7,4, т.е. такая частица имеет суммарный отрицательный заряд при физиологическом pH. Например, изoeлектрическая точка частицы может быть от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,4, например, от приблизительно 6,4 до приблизительно 7,4. Частица, содержащая суммарный отрицательный заряд при физиологическом pH, менее вероятно будет взаимодействовать с эукариотическими клетками (например, клетками млекопитающего), потому что эукариотические клетки обычно содержат клеточные мембраны с суммарным отрицательным зарядом. Частица предпочтительно не содержит достаточного заряда (и/или плотности заряда) для обеспечения неспецифических взаимодействий с другими заряженными молекулами.

III. Частицы, содержащие поры.

В некоторых вариантах осуществления материал, используемый для получения частиц (например, кремний), может иметь пористость от приблизительно 40% до приблизительно 95%, например, от приблизительно 60% до приблизительно 80%. Как использовано в данном документе, пористость является мерой пустых пространств в материале и представляет собой долю объема пустот в общем объеме материала. В некоторых вариантах осуществления материал-основа имеет пористость по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80% или даже по меньшей мере приблизительно 90%. В отдельных вариантах осуществления пористость больше чем приблизительно 40%, например больше чем приблизительно 50%, больше чем приблизительно 60% или даже больше чем приблизительно 70%.

В некоторых вариантах осуществления агент распределен по глубине пор от поверхности материала по меньшей мере приблизительно 0,005 мкм, по меньшей мере 0,05 мкм, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкм, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкм, по меньшей мере приблизительно 0,3 мкм, по меньшей мере приблизительно 0,4 мкм, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкм, по меньшей мере приблизительно 0,6 мкм или по меньшей мере приблизительно 0,7 мкм. В некоторых вариантах осуществления агент распределен по порам материала-основы по существу равномерно.

Агент может быть погружен в частицу на глубину, которая измеряется как отношение к общей ширине частицы. В некоторых вариантах осуществления агент распределен на глубину по меньшей мере приблизительно 10% частицы, по меньшей мере приблизительно 20% частицы, по меньшей мере приблизительно 30% частицы, по меньшей мере приблизительно 40% частицы, по меньшей мере приблизительно 50% частицы или по меньшей мере приблизительно 60% частицы.

Известны способы иммобилизации агента на пористой частице, включая способы как иммобилизации агента на первой поверхности частицы, так и иммобилизации другой молекулы (например, покрытия) на второй поверхности частицы (см., например, Cauda, V. et al. J. Am. Chem. Soc. 131 (32):11361-11370 (2009) and Guan, B. et al. Langmuir, 27(1):328-334 (2011), каждая из которых включена настоящим посредством ссылки во всей своей полноте). Кроме того, такие способы обычно применимы для получения любых частиц, описанных в данном документе.

Размер пор может быть выбран заранее по пространственным характеристикам агента и биомолекулы-мишени для регулирования высвобождения биомолекулы. Обычно слишком маленькие размеры пор препятствуют загрузке агента и/или связыванию биомолекулы. Например, средний диаметр пор для материала можно выбирать из больших пор, например от 15 до 40 нм, для молекул с высокой молекулярной массой, например 200000-500000 а.е.м. И маленьких пор, например, от 2 до 10 нм, для молекул с низкой молекулярной массой, например, 10000-500000 а.е.м., например, средние размеры пор от приблизительно 6 нм в диаметре могут подходить для молекул с молекулярной массой приблизительно 14000-15000 а.е.м., например, приблизительно 14700 а.е.м. Средние размеры пор приблизительно 10 нм в диаметре можно выбирать для молекул с молекулярной массой приблизительно 45000-50000 а.е.м., например, приблизительно 48000 а.е.м. Средние размеры пор приблизительно 25-30 нм в диаметре можно выбирать для молекул с молекулярной массой приблизительно 150000 нм.

Размер пор может быть выбран заранее для адаптации к радиусам молекул агента или биомолекулы. Например, средние размеры пор от приблизительно 25 нм до приблизительно 40 нм в диаметре могут быть подходящими для молекул с наибольшим радиусом молекулы от приблизительно 6 нм до приблизительно 8 нм. Радиусы молекул можно рассчитать любым подходящим способом, например, за счет использования физических измерений молекулы на основании данных рентгенокристаллографии или за счет использования гидродинамического радиуса, который отражает размер молекулы в состоянии раствора. Так как расчет состояния раствора зависит от природы раствора, для которого делается расчет, для некоторых измерений может быть предпочтительно использование физических измерений молекулы на основании данных рентгенокристаллографии. Как использовано в данном документе, наибольший ради-

ус молекулы отражает половину наибольшего измерения терапевтического агента.

В некоторых вариантах осуществления средний диаметр пор выбирают для ограничения агрегации молекул, например, белков, внутри поры. Было бы предпочтительно предотвращать агрегирование биомолекул, таких как белки, в материале-основе, так как считается, что это затрудняет регулируемое высвобождение молекул в биологическую систему. Вследствие этого, пора, которая вследствие взаимосвязи между ее размером и размером биомолекулы позволяет одновременно вводить в пору, например, только одну биомолекулу, будет предпочтительнее поры, которая позволяет вместе вводить в пору множество биомолекул и агрегировать их внутри поры. В некоторых вариантах осуществления в пору может быть загружено множество биомолекул, но благодаря глубине поры белки, распределенные по этой глубине поры, будут агрегировать в меньшей степени.

IV. Частицы, содержащие по меньшей мере одну трубку.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит по меньшей мере одну трубку. В предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере одна трубка содержит один открытый конец или два открытых конца.

Термин "трубка" относится к трехмерной форме, имеющей длину вдоль оси (например, одномерной оси в декартовом пространстве), и внутреннюю полость, просвет, пустоту или резервуар по длине формы. В некоторых вариантах осуществления перпендикулярные поперечные сечения вдоль оси трубки имеют по существу идентичную форму и/или размер. Термин "поперечное сечение", как использовано в отношении трубки, относится к двумерному поперечному сечению, которое перпендикулярно оси трубки. Трубку может содержать более большая конструкция. Например, трубку содержит шприц, но трубка не содержит поршень шприца. Частица или другое изделие может содержать более чем одну трубку. Например, шприц может содержать две трубки, соответствующие игле шприца и цилиндру шприца, или параллельным цилиндрам двойного шприца (например, используемого для эпоксидных составов).

Трубка может иметь диаметр, который составляет среднюю длину линейных сегментов, которые перпендикулярны оси трубки, при этом каждый линейный сегмент связан двумя точками на внешней поверхности трубки. Трубка может иметь ширину и высоту, при этом ширина трубки составляет самый длинный линейный сегмент, образованный двумя точками на внешней поверхности трубки, который перпендикулярен оси трубки, а высота трубки составляет линейный сегмент, образованный двумя точками на внешней поверхности трубки, который перпендикулярен как оси трубки, так и линейному сегменту, образующему ширину трубки.

Трубка может иметь внутренний диаметр, который составляет среднюю длину линейных сегментов, которые перпендикулярны оси трубки, при этом каждый линейный сегмент связан двумя точками на внутренней поверхности трубки. Трубка может иметь внутреннюю ширину и внутреннюю высоту, при этом внутренняя ширина трубки составляет самый длинный линейный сегмент, образованный двумя точками на внешней поверхности трубки, который перпендикулярен оси трубки, и внутренняя высота трубки составляет линейный сегмент, образованный двумя точками на внешней поверхности трубки, который перпендикулярен как оси трубки, так и линейному сегменту, образующему ширину трубки.

Трубка может быть по существу цилиндрической. Трубка может иметь по существу круглое поперечное сечение. Поперечное сечение трубки может представлять собой эллипсоид, например, круг.

Поперечное сечение трубки может представлять собой многоугольник, например, правильный многоугольник. Поперечное сечение трубки может представлять собой треугольник, например, равнобедренный треугольник. Поперечное сечение трубки может представлять собой четырехугольник, например, правильный четырехугольник, прямоугольник или квадрат. Поперечное сечение трубки может представлять собой пятиугольник, например, правильный пятиугольник. Поперечное сечение трубки может представлять собой шестиугольник, например, правильный шестиугольник. Трубкой может быть треугольная трубка, квадратная трубка, пятиугольная трубка, шестиугольная трубка, семиугольная трубка или восьмигранная трубка.

Длина трубки может составлять от приблизительно 5 нм до приблизительно 5 мкм, например от приблизительно 5 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 5 нм до приблизительно 1 мкм. Длина трубки может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 50 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 50 нм до приблизительно 1 мкм. Длина трубки может составлять от приблизительно 100 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 100 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 100 нм до приблизительно 1 мкм. Длина трубки может составлять от приблизительно 300 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 300 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 300 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 300 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 300 нм до приблизительно 1 мкм. Длина трубки может составлять от приблизительно 500 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 500 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 500 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 500 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 500 нм до приблизительно 1

мкм.

Диаметр, ширина и/или высота трубки могут составлять от приблизительно 5 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 5 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 5 нм до приблизительно 100 нм. Диаметр, ширина и/или высота трубки может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 50 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм.

Внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки предпочтительно достаточно большие для размещения как агента, так и биомолекулы. Внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки предпочтительно достаточно маленькие, чтобы ингибировать вхождение клетки во внутреннюю часть трубки (например, ядросодержащей эукариотической клетки, например ядросодержащей человеческой клетки или диплоидной человеческой клетки). Внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки могут составлять от приблизительно 5 нм до приблизительно 4 мкм, например, от приблизительно 5 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 5 нм до приблизительно 100 нм. Внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки могут составлять от приблизительно 20 нм до приблизительно 4 мкм, например, от приблизительно 20 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 20 нм до приблизительно 100 нм. Внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 4 мкм, например, от приблизительно 40 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 40 нм до приблизительно 100 нм.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления частица содержит множество трубок. Каждая трубка из множества трубок может быть по существу параллельной. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две трубки из множества трубок являются непараллельными. В некоторых вариантах осуществления ни одна трубка из множества трубок не является параллельными. Трубки могут быть расположены в иной конфигурации, чем параллельная, чтобы распределить отверстия в трубках по разным сторонам частицы, или чтобы позволить частице падать в потоке (например, в ламинарном потоке или в турбулентном потоке).

Множество трубок может быть расположено в виде решетки или пучка.

Множество трубок может быть расположено в виде многогранника, например, правильного многогранника. Множество трубок может быть расположено в виде четырехгранника, например, правильного четырехгранника. Множество трубок может быть расположено в виде шестигранника, например, кубоида, прямоугольного кубоида или куба. Множество трубок может быть расположено в виде восьмигранника, например, правильного восьмигранника. Множество трубок может быть расположено в виде десятигранника, например, правильного десятигранника. Множество трубок может быть расположено в виде двадцатигранника, например, правильного двадцатигранника. В некоторых вариантах осуществления каждое ребро многогранника образовано единственной трубкой. В некоторых вариантах осуществления меньше чем каждое ребро многогранника образовано единственной трубкой (например, при этом каждая

трубка по существу параллельная).

Множество трубок может быть расположено в виде пирамиды, например, треугольной пирамиды, пирамиды с ромбом в основании, прямоугольной пирамиды, квадратной пирамиды, пятиугольной пирамиды, шестиугольной пирамиды, семиугольной пирамиды или восьмиугольной пирамиды. Множество трубок может быть расположено в виде прямой пирамиды или наклонной пирамиды. В некоторых вариантах осуществления каждое ребро пирамиды образовано единственной трубкой. В некоторых вариантах осуществления меньше чем каждое ребро пирамиды образовано единственной трубкой (например, при этом каждая трубка по существу параллельная).

Множество трубок может быть расположено в виде призмы, например, треугольной призмы, прямоугольной призмы, квадратной призмы, пятиугольной призмы, шестиугольной призмы, семиугольной призмы или восьмиугольной призмы. Множество трубок может быть расположено в виде прямой призмы, наклонной призмы или усеченной призмы. В некоторых вариантах осуществления каждое ребро призмы образовано единственной трубкой. В некоторых вариантах осуществления меньше чем каждое ребро призмы образовано единственной трубкой (например, при этом каждая трубка по существу параллельная).

Множество трубок может быть расположено в конфигурации, которая имеет длину, ширину и высоту, при этом ни одно измерение не больше более чем в 5 раз, чем любое другое измерение.

Например, множество трубок может быть расположено в конфигурации, в которой ни одно измерение не больше более чем в 4 раза чем любое другое измерение, или ни одно измерение не больше более чем в 3 раза чем любое другое измерение. Такие конфигурации подходят, например, для внутривенного введения частицы, потому что продолговатые частицы не могут протекать также в кровотоке пациента.

Множество трубок может быть расположено в конфигурации, которая имеет длину и диаметр, при этом длина конфигурации не более чем в 5 раз больше ее диаметра. Множество трубок может быть расположено в конфигурации, в которой длина конфигурации не более чем в 4 раза больше ее диаметра, или длина конфигурации не более чем в 3 раз больше ее диаметра. Такие конфигурации подходят, например, для внутривенного введения частицы, потому что продолговатые частицы не могут протекать также в кровотоке пациента.

Частица может содержать 1-500 трубок, например 1-100 трубок. Частица может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 трубок.

Множество трубок может включать 1-500 трубок, например 1-100 трубок. Множество трубок может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 трубок.

Каждая трубка из множества трубок может иметь одинаковую длину, или разные трубки из множества трубок могут иметь разную длину. Средняя длина трубки может составлять от приблизительно 5 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 5 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 5 нм до приблизительно 1 мкм. Средняя длина трубки может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 50 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 50 нм до приблизительно 1 мкм. Средняя длина трубки может составлять от приблизительно 100 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 100 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 100 нм до приблизительно 1 мкм. Средняя длина трубки может составлять от приблизительно 300 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 300 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 300 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 300 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 300 нм до приблизительно 1 мкм. Средняя длина трубки может составлять от приблизительно 500 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 500 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 500 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 500 нм до приблизительно 2 мкм или от приблизительно 500 нм до приблизительно 1 мкм.

Каждая трубка из множества трубок может иметь одинаковый диаметр, ширину и/или высоту, или разные трубки из множества трубок могут иметь разные диаметры, ширину и/или высоту. Средний диаметр, ширина и/или высота трубки может составлять от приблизительно 5 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 5 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 400

нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 5 нм до приблизительно 100 нм. Средний диаметр, ширина и/или высота трубки может составлять от приблизительно 50 нм до приблизительно 5 мкм, например, от приблизительно 50 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм.

Каждая трубка из множества трубок может иметь одинаковые внутренний диаметр, внутреннюю ширину и/или внутреннюю высоту, или разные трубки из множества трубок могут иметь разные внутренние диаметры, ширину и/или высоту. Средний внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки может составлять от приблизительно 5 нм до приблизительно 4 мкм, например, от приблизительно 5 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 5 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 5 нм до приблизительно 100 нм. Средний внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки может составлять от приблизительно 20 нм до приблизительно 4 мкм, например, от приблизительно 20 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 20 нм до приблизительно 100 нм. Средний внутренний диаметр, внутренняя ширина и/или внутренняя высота трубки может составлять от приблизительно 40 нм до приблизительно 4 мкм, например, от приблизительно 40 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 1 мкм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 900 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 700 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 500 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 200 нм или от приблизительно 40 нм до приблизительно 100 нм.

Трубка может содержать, например, полимер. Полимером может быть существующий в природе полимер или синтетический полимер. Полимером может быть, например, нуклеиновая кислота (например, ДНК) или белок.

V. Частицы, содержащие каркас ДНК.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит каркас ДНК, например, частица может содержать ДНК-оригами каркас (см., например, патент США №№ 8554489 и 7842793; публикацию патентной заявки США №№ 2013/0224859 и 2010/0216978 и публикацию патентной заявки РСТ № 2014/170898, каждая из которых включена настоящим посредством ссылки).

Частица может содержать каркас ДНК, и каркас ДНК может содержать по меньшей мере одну трубку или множество трубок, как описано в данном документе. Например, каркас ДНК может содержать по меньшей мере одну по существу шестиугольную трубку (см., например, публикацию патентной заявки США № 2013/0224859, включенную настоящим посредством ссылки).

Каркас ДНК может содержать сетку или решетку, например, шестиугольную решетку или квадратную решетку (см., например, патент США № 8554489, включенный настоящим посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления частица содержит каркас ДНК, и каркас ДНК не содержит трубку. Например, каркас ДНК может содержать трехмерную форму, например, многогранник, а агент может быть иммобилизован во внутренней поверхности формы.

Каркас ДНК может содержать многогранник, например, правильный многогранник. Каркас ДНК может содержать четырехгранник, например, правильный четырехгранник. Каркас ДНК может содержать шестигранник, например, кубоид, прямоугольный кубоид или куб. Каркас ДНК может содержать восьмигранник, например, правильный восьмигранник. Каркас ДНК может содержать десятигранник, например, правильный десятигранник. Каркас ДНК может содержать двадцатигранник, например, правильный двадцатигранник.

Каркас ДНК может содержать пирамиду, например, треугольную пирамиду, пирамиду с ромбом в основании, прямоугольную пирамиду, квадратную пирамиду, пятиугольную пирамиду, шестиугольную пирамиду, семиугольную пирамиду или восьмиугольную пирамиду. Каркас ДНК может содержать пря-

мую пирамиду или наклонную пирамиду.

Каркас ДНК может содержать призму, например, треугольную призму, прямоугольную призму, квадратную призму, пятиугольную призму, шестиугольную призму, семиугольную призму или восьмиугольную призму. Каркас ДНК может содержать прямую призму, наклонную призму или усеченную призму.

Каркас ДНК может содержать длину, ширину и высоту, при этом ни одно измерение не больше более чем в 5 раз, чем любое другое измерение. Например, ни одно измерение не может быть больше более чем в 4 раза, чем любое другое измерение, или ни одно измерение не может быть больше более чем в 3 раза, чем любое другое измерение. Такие конфигурации подходят, например, для внутривенного введения частицы, потому что продолговатые частицы не могут протекать также в кровотоке пациента.

В некоторых вариантах осуществления агент иммобилизован на каркасе ДНК. В некоторых вариантах осуществления агент связан с нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности на каркасе ДНК, т.е. нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с обратным комплементом нуклеотидной последовательности каркаса ДНК. Таким образом, агент может быть иммобилизован на поверхности частицы путем гибридизации нуклеиновой кислоты с каркасом ДНК.

VI. Частицы, содержащие защитный элемент.

Частица может содержать коровую субчастицу и защитный элемент, например, при этом защитный элемент ингибирует взаимодействие биомолекул, связанных с коровой субчастицей, с молекулами на поверхности клетки. Защитный элемент может содержать множество защитных компонентов. Коровая субчастица может содержать кремнезем. Например, коровая субчастица может содержать кремнеземную поверхность. Коровая субчастица может содержать золото, кремний или полимер. Например, коровая субчастица может содержать золото, кремний или полимерную поверхность.

Частица, содержащая внутреннюю коровую субчастицу и имеющая защитный элемент, содержащий множество защитных компонентов, соединенных с коровой субчастицей, может содержать коровую субчастицу, содержащую кремнеземную поверхность, например, сплошную кремнеземную субчастицу, пористую кремнеземную субчастицу или кремнеземную нанооболочку, имеющую некремнеземную внутреннюю часть. Коровая субчастица может содержать некремнеземный коровый материал, например, кремний или золото, покрытое кремнеземом. Защитные компоненты могут быть в форме защитных субчастиц, которые меньше чем коровая субчастица, таких как наносферы, и могут содержать кремнезем или иной материал, например, золото или полимер. Можно выбрать, чтобы материал поверхности коровой субчастицы и защитных компонентов был разным, чтобы обеспечить использование разной химии соединения для соединения с поверхностями дополнительных компонентов или разновидностей.

Агент может быть предоставлен на поверхности коровой субчастицы, но в меньшей степени или предпочтительно совсем не предоставлен на поверхности защитных компонентов. Например, агент может быть соединен с поверхностью кремнеземной коровой субчастицы с помощью связи (например, ионной, ковалентной или электростатического взаимодействия), которая образуется предпочтительно (или исключительно) с кремнеземной коровой субчастицей, а не с защитными субчастицами, например, имеющими золотую поверхность вместо кремнеземной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления такая частица может содержать кремнеземную сердцевину, например, по существу сферическую кремнеземную сердцевину, и защитный элемент, содержащий множество золотых наночастиц на поверхности кремнеземной сердцевины, при этом золотые наночастицы имеют размер в поперечном разрезе меньше чем размер сердцевины в поперечном разрезе, например, диаметр сердцевины. Золотые наночастицы могут быть по существу сферическими. Коровая субчастица может быть сплошной и непористой или может иметь пористую поверхность. Можно добиться образования кремнеземной сердцевины и золотых наночастиц на сердцевине, например, как описано в патентах США № 6344272, Sadtler and Wei, Chem. Comm. 1604-5 (2002); Meuhlig et al., ACS Nano, 5(8):6586-6592 (2011) (каждый из которых включен в данный документ настоящим посредством ссылки во всей своей полноте). Например, золотые наночастицы могут быть адсорбированы на кремнеземной сердцевине с аминовым покрытием посредством электростатического притяжения, или могут быть связаны с кремнеземной сердцевиной, имеющей тиольные группы, конъюгированные с кремнеземной поверхностью, которые затем связываются с золотой поверхностью золотых наночастиц.

Коровая субчастица может иметь размер в поперечном разрезе, например, диаметр сферической или цилиндрической субчастицы от 50 нм до 4 мкм, например, от 50 нм до 200 нм, от 100 нм до 500 нм, от 200 нм до 1 мкм или от 500 нм до 4 мкм.

Частицы могут быть составлены из диапазона диаметров коровых субчастиц и диаметров защитных субчастиц. Доступная площадь поверхности коровой субчастицы для утилизации биомолекулы может зависеть от диаметра защитных субчастиц и эффективной высоты над поверхностью коровой субчастицы, необходимой для связывания комплекса мишень/агент с поверхностью, включая эффективное пространство над поверхностью между поверхностью и агентом захвата.

Количество агентов, которые могут быть связаны с коровой субчастицей, можно рассчитать на осно-

вании площади поверхности субчастицы. Аналогично, количество биомолекул-мишеней, которые могут быть связаны с коровой субчастицей, можно рассчитать аналогичным образом. Такие расчеты могут быть подтверждены, например, исследованиями связывания белков *in vitro*, и могут использоваться для прогнозирования дозы частиц, которые могут потребоваться для утилизации выбранного количества биомолекул-мишеней (или в некоторых вариантах осуществления эффективной дозы частиц или содержащей их готовой формы для выведения некоторого количества биомолекул-мишеней из системы, например, из системы *in vitro* или из кровотока пациента при лечении заболевания, или уменьшения их концентрации).

Частица может содержать доступную площадь поверхности для захвата мишени от 0,01 мкм² до 50 мкм², например, от 0,01 мкм² до 0,1 мкм², от 0,05 мкм² до 0,5 мкм², от 0,1 мкм² до 1,0 мкм², от 0,5 мкм² до 5 мкм², от 1,0 мкм² до 10 мкм², от 5 мкм² до 25 мкм² или от 10 мкм² до 50 мкм². Для выбранной загрузки агента на единицу площади поверхности коровой субчастицы, может быть установлена максимальная доза частиц, подходящая для утилизации необходимого количества биомолекул-мишеней на основании диаметров коровых и защитных субчастиц.

Размер в поперечном разрезе, например, диаметр защитной субчастицы, может быть кратным размеру в поперечном разрезе, например, диаметру коровой частицы. Кратное число может составлять, например, 0,01-0,5, например 0,02-0,2, например 0,05-0,1.

Для эффективного доступа биомолекулы-мишени к агенту мишень должна быть способна диффундировать между защитными компонентами для достижения агента на поверхности коровой субчастицы. Например, мишени менее чем 100 кДа (например, sTNF-R1/2) имеют размеры, которые могут легко диффундировать между защитными сферами, которые составляют 40 нм в диаметре или более. Для меньших защитных сфер эффективная длина пор между сферами является короткой, и, таким образом, маловероятно, чтобы защитные сферы, которые меньше чем 40 нм, аналогичным образом затрудняли диффузию.

VII. Частицы, содержащие субчастицы.

В некоторых вариантах осуществления частица может содержать коровую субчастицу и множество защищающих субчастиц. Частица может содержать защитный элемент, а защитный элемент может содержать множество защищающих субчастиц. Агент может быть иммобилизован на поверхности коровой субчастицы, например, при этом поверхность коровой субчастицы является внутренней поверхностью. Множество защищающих субчастиц может быть выполнено, чтобы ингибировать взаимодействие биомолекулы со вторым элементом пары специфического связывания, например, при связывании биомолекулы с частицей. Множество защищающих субчастиц может быть выполнено, чтобы ингибировать взаимодействие между биомолекулой и клеткой, например, клеткой млекопитающего, например, при связывании биомолекулы с частицей.

Защищающие субчастицы могут образовывать внешнюю поверхность. В предпочтительных вариантах осуществления агент не иммобилизован на поверхности защищающих субчастиц.

Коровая субчастица предпочтительно достаточно большая для связывания более чем с одной молекулой агента. Например, коровая субчастица может иметь размер от приблизительно 20 нм до приблизительно 4 мкм, например, иметь размер от приблизительно 50 нм до приблизительно 2 мкм. Коровая субчастица может иметь размер от приблизительно 100 нм до приблизительно 1000 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 1000 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 1000 нм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 600 нм до приблизительно 1000 нм или от приблизительно 600 нм до приблизительно 800 нм. Коровая субчастица может иметь размер от приблизительно 100 нм до приблизительно 4 мкм, от 100 нм до приблизительно 3 мкм, от 100 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 4 мкм, от 200 нм до приблизительно 3 мкм, от 200 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 4 мкм, от 400 нм до приблизительно 3 мкм, от 400 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 600 нм до приблизительно 4 мкм, от 600 нм до приблизительно 3 мкм, от 600 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 800 нм до приблизительно 4 мкм, от 800 нм до приблизительно 3 мкм или от 800 нм до приблизительно 2 мкм.

Коровая субчастица может содержать металл, золото, оксид алюминия, стекло, кремнезем, кремний, крахмал, агарозу, латекс, пластмассу, полиакриламид, метакрилат, полимер или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления коровая субчастица содержит кремний, например, пористый кремний.

Коровая субчастица может быть любой формы (например, кубической, пирамидальной, конической, сферической, цилиндрической, диска, четырехгранной, шестигранной, восьмигранной, двенадцатигранной или двадцатигранной), или коровая субчастица может не иметь определенную форму.

Частица может содержать 1 коровую субчастицу. Например, коровой субчастицей может быть частица патентов США №№ 7368295 или 8920625 (каждый из которых включен настоящим посредством

ссылки во всей своей полноте), которая дополнительно связана с множеством защищающих субчастиц.

Частица может содержать множество коровых субчастиц, например, 2-300 коровых субчастиц, 2-200 коровых субчастиц, 2-150 коровых субчастиц, 2-100 коровых субчастиц, 2-80 коровых субчастиц или 2-42 коровых субчастиц (см., например, фиг. 4 и 5). В вариантах осуществления, в которых частица содержит множество коровых субчастиц, каждая из коровых субчастиц предпочтительно является по существу сферической. Частица, содержащая множество сферических коровых субчастиц, обеспечивает пустоты, допуская посредством этого диффузию растворимых биомолекул через внутреннюю часть частицы. Тем не менее, пустоты могут обеспечивать коровые субчастицы разных других форм. Частица, содержащая множество коровых субчастиц, может содержать коровые субчастицы различных форм и размеров.

Частица может содержать от 1 до приблизительно 10^6 коровых субчастиц, от 1 до приблизительно 10^5 коровых субчастиц, от 1 до приблизительно 10^4 коровых субчастиц, от 1 до приблизительно 1000 коровых субчастиц, от 1 до приблизительно 100 коровых субчастиц или от 1 до приблизительно 10 коровых субчастиц. Частица может содержать от 2 до приблизительно 10^6 коровых субчастиц, от 2 до приблизительно 10^5 коровых субчастиц, от 2 до приблизительно 10^4 коровых субчастиц, от 2 до приблизительно 1000 коровых субчастиц, от 2 до приблизительно 100 коровых субчастиц или от 2 до приблизительно 10 коровых субчастиц. Частица может содержать от приблизительно 10 до приблизительно 10^6 коровых субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 10^5 коровых субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 10^4 коровых субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 коровых субчастиц или от приблизительно 10 до приблизительно 100 коровых субчастиц.

Коровая субчастица может содержать поры, т.е. коровая субчастица может быть пористой.

Защищающая субчастица может содержать металл, золото, оксид алюминия, стекло, кремнезем, кремний, крахмал, агарозу, латекс, пластмассу, полиакриламид, метакрилат, полимер или нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления каждая защищающая субчастица из множества защищающих субчастиц связана с коровой субчастицей. В некоторых вариантах осуществления некоторые защищающие субчастицы из множества защищающих субчастиц связаны с коровой субчастицей, а каждая защищающая субчастица из множества, которая не прямо связана с коровой субчастицей, связана с защищающей субчастицей, т.е. так, что каждая защищающая субчастица из множества либо непосредственно, либо опосредованно связана с коровой субчастицей. Таким образом, частица может содержать единственный слой защищающих субчастиц (например, при этом по существу все защищающие субчастицы связаны прямо с одной или более коровой субчастицей (субчастицами)), или частица может содержать более чем один слой защищающих субчастиц (например, при этом существенная часть защищающих субчастиц опосредованно связаны с одной или более коровой субчастицей (субчастицами) через прямые связи с другими защищающими субчастицами).

В некоторых вариантах осуществления частица содержит первый слой защищающих субчастиц, содержащих первый материал, и второй слой защищающих субчастиц, содержащих второй материал. Например, первым материалом может быть кремнезем или кремний, а вторым материалом может быть золото. Частица может быть составлена, например, путем связывания субчастиц первого слоя субчастиц с одной или более коровыми субчастицами, и затем связывания субчастиц второго слоя субчастиц с первым слоем субчастиц. Субчастицы второго слоя могут содержать поверхность, аналогичную коровой субчастице (субчастицам), например, обеспечивая посредством этого связывание субчастиц первого слоя как с коровой субчастицей (субчастицами), так и с субчастицами второго слоя, используя аналогичные химические связи.

Частица может быть составлена с использованием метода слой за слоем. Например, частица может быть образована путем сперва связывания множества коровых субчастиц. Множество коровых субчастиц может быть по существу однородным, например, так, что связывающая молекула может перекрестно сшивать коровые субчастицы. Множество субчастиц может содержать по меньшей мере два типа субчастиц, например, с разными формами, размерами и/или поверхностями, которые обеспечивают необходимую особенность, например, пустоты внутри частицы. После связывания множества коровых субчастиц, множество защищающих субчастиц может быть связано с множеством коровых субчастиц. После связывания множества защищающих субчастиц с коровыми субчастицами, второе множество защищающих субчастиц может быть связано с множеством защищающих субчастиц. Тем не менее, частица может быть составлена многими различными путями, и может быть задействовано множество разных стратегий образования слоя за слоем в зависимости от необходимых свойств частицы и необходимых химических связей, используемых для связывания субчастиц.

Известны способы поперечного сшивания субчастиц, включая способы поперечного сшивания субчастиц, которые содержат антитела для применения *in vivo* (см., например, Cheng, K. et al. ACS Appl Mater Interfaces 2(9):2489-2495 (2010), включенную настоящим посредством ссылки во всей своей полноте). Такие способы могут быть приспособлены для получения частицы, как описано в данном документе, например, путем простого изменения относительных размеров субчастиц.

Защищающая субчастица может быть от приблизительно 10 нм до приблизительно 4 мкм по разме-

ру, например, от приблизительно 10 нм до приблизительно 1 мкм по размеру или от приблизительно 20 нм до приблизительно 500 нм по размеру. Защищающая субчастица может быть от приблизительно 10 нм до приблизительно 200 нм, от 10 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 10 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 10 нм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 10 нм до приблизительно 40 нм, от приблизительно 10 нм до приблизительно 20 нм, от 20 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 60 нм, от приблизительно 20 нм до приблизительно 40 нм, от 30 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 80 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 60 нм, от 60 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 100 нм или от приблизительно 60 нм до приблизительно 80 нм по размеру. Защищающая субчастица может составлять от приблизительно 100 нм до приблизительно 1000 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 400 нм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 1000 нм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 800 нм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 600 нм, от приблизительно 600 нм до приблизительно 1000 нм или от приблизительно 600 нм до приблизительно 800 нм по размеру. Защищающая субчастица может составлять от приблизительно 100 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 200 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 400 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 600 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 600 нм до приблизительно 3 мкм, от приблизительно 600 нм до приблизительно 2 мкм, от приблизительно 800 нм до приблизительно 4 мкм, от приблизительно 800 нм до приблизительно 3 мкм или от приблизительно 800 нм до приблизительно 2 мкм по размеру.

Частица может содержать от 1 до приблизительно 10^6 защищающих субчастиц, от приблизительно 4 до приблизительно 10^6 защищающих субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 10^6 защищающих субчастиц, от 1 до приблизительно 10^5 защищающих субчастиц, от приблизительно 4 до приблизительно 10^5 защищающих субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 10^5 защищающих субчастиц, от 1 до приблизительно 10^4 защищающих субчастиц, от приблизительно 4 до приблизительно 10^4 защищающих субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 10^4 защищающих субчастиц, от 1 до приблизительно 1000 защищающих субчастиц, от приблизительно 4 до приблизительно 1000 защищающих субчастиц, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 защищающих субчастиц, от 1 до приблизительно 100 защищающих субчастиц, от приблизительно 4 до приблизительно 100 защищающих субчастиц или от приблизительно 10 до приблизительно 100 защищающих субчастиц.

Коровая субчастица и защищающая субчастица могут иметь или не иметь аналогичные или идентичные формы, размеры и композиции. Тем не менее, коровая субчастица отличается от защищающей субчастицы, потому что (1) агент может быть иммобилизован на коровой субчастице, тогда как агент предпочтительно не иммобилизуется на защищающей субчастице, и (2) коровые субчастицы предпочтительно расположены во внутренней части частицы, тогда как защищающие субчастицы могут существовать на внешней поверхности частицы.

VIII. По существу 2-мерные частицы.

Частица может иметь 2-мерную форму. Например, частица может представлять собой круг, кольцо, крест, рыбу, кость, эллипс, треугольник, квадрат, пятиугольник, шестиугольник, семиугольник, восьмиугольник или звезду. Частица может представлять собой звезду, и звезда может представлять собой вогнутый шестиугольник, вогнутый восьмиугольник, вогнутый десятиугольник или вогнутый двенадцатиугольник, формой может быть правильная форма или неправильная форма. На фиг. 6 показаны примеры по существу 2-мерных частиц.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит первую сторону, вторую сторону и ребро. Первая сторона и вторая сторона могут иметь по существу одинаковую форму. Первая сторона и вторая сторона могут иметь длину и ширину. Ребро может определять высоту, которая составляет расстояние между первой стороной и второй стороной. Ширина и длина могут быть по меньшей мере в 4 раза больше, чем высота, например, в 4-1000 раз больше, в 6-100 раз больше, в 8-75 раз больше или в 10-50 раз больше, чем высота, ширина и/или длина могут быть больше, чем высота от 0,2 раза до приблизительно 20 раз.

Ребро может содержать один или более вогнутых или направленных внутрь участков. Агент может быть связан с вогнутыми или направленными внутрь участками ребра. Направленным внутрь участком является участок, в котором периметр частицы содержит два примыкающих участка периметра с наружным углом между ними больше чем 270° , например, каждая сторона концов звезды. Таким образом, агент захвата может быть защищен от контакта с мембраной клетки при контакте с частицей.

В некоторых вариантах осуществления первая сторона и/или вторая сторона являются по существу плоскими. В некоторых вариантах осуществления первая сторона и/или вторая сторона содержат вогнутый или направленный внутрь участок.

В некоторых вариантах осуществления частица имеет вид по существу плоской звезды, например, с направленными внутрь участками между концами. Звезда может иметь 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более концов. Частица может содержать правильные стороны или неправильные стороны.

В некоторых вариантах осуществления частица имеет вид креста или форму рыбьей кости, например, содержащей остов с плечами, продолжающимися с каждой стороны наружу от остова с образованием внутренних участков поверхности между плечами. Плечи креста или рыбьей кости могут дополнительно содержать боковые выступы.

Направленные внутрь ребра между концами звезды или плечами креста или рыбьей кости предпочтительно тянутся на расстояние от линии, соединяющей концы, так чтобы клеточная мембрана не могла деформироваться между концами с тем, чтобы входить в контакт с ребрами. Например, количество концов и угол между ними может определять глубину направленных внутрь участков ребра между концами.

Частицы, подходящие для применения в изобретении, могут быть образованы с помощью нанопроизводства, например, путем нанопечати или наноформовки. Например, частицы могут быть изготовлены методом PRINT ("репликация частиц в несмачиваемых матрицах") (см., например, международная патентная заявка WO 2007/024323; Perry, J.L. et al. *Acc Chem Res.* 44 (10):990-998 (2011), каждая из которых включена настоящим посредством ссылки). Частицы могут быть изготовлены с помощью фотолитографии, используя известные способы.

В некоторых вариантах осуществления агент может быть иммобилизован на ребре частицы и не иммобилизован, или иммобилизован в меньшей степени на первой и второй сторонах частицы.

В некоторых вариантах осуществления требуемая площадь поверхности на частицу находится в диапазоне 0,2-25 мкм². Вследствие этого площади защищенных участков ребер частиц, которые можно получать путем наноформования, находятся в требуемом диапазоне.

IX. Агент.

В некоторых вариантах осуществления агентом, иммобилизованным на поверхности частицы, является молекула, макроциклическое соединение, полипептид, пептидомиметическое соединение, аптамер, нуклеиновая кислота или аналог нуклеиновой кислоты. "Молекула", как использовано в данном документе, означает ссылку на агент, который имеет молекулярную массу менее чем приблизительно 6 кДа и наиболее предпочтительно менее чем приблизительно 2,5 кДа. Многие фармацевтические компании имеют обширные библиотеки химических и/или биологических смесей, содержащих массивы молекул, часто экстрактов грибов, бактерий или водорослей, которые можно скринировать с помощью любого из анализов заявки. Среди прочего, в этой заявке предусмотрено использование небольших химических библиотек, библиотек пептидов или наборов натуральных продуктов. У Tan et al. Описана библиотека со свыше двух миллионов синтетических соединений, которая совместима с миниатюризированными клеточными анализами (*J Am Chem Soc* 120:8565-8566(1998)).

Пептидомиметики могут представлять собой соединения, в которых модифицирована по меньшей мере часть рассматриваемого полипептида, а трехмерная структура пептидомиметика остается по существу такой же, как структура рассматриваемого полипептида. Пептидомиметиками могут быть аналоги рассматриваемого полипептида раскрытия, которые сами по себе представляют собой полипептиды, содержащие одну или более замен или других модификаций внутри рассматриваемой полипептидной последовательности. В качестве альтернативы, по меньшей мере часть рассматриваемой полипептидной последовательности может быть заменена непептидной структурой так, чтобы по существу сохранялась трехмерная структура рассматриваемого полипептида. Другими словами, один, два или три аминокислотных остатка внутри рассматриваемой полипептидной последовательности могут быть заменены непептидной структурой. В дополнение, другие участки пептидов рассматриваемого полипептида могут, но не обязательно, быть заменены непептидной структурой. Пептидомиметики (как пептидные, так и непептидные аналоги) могут иметь улучшенные свойства (например, уменьшенный протеолиз, повышенную ретенцию или повышенную биодоступность). Пептидомиметики обычно имеют улучшенную пероральную доступность, которая делает их особенно подходящими для лечения людей или животных. Необходимо заметить, что пептидомиметики могут иметь или не иметь сходные двумерные химические структуры, но имеют общие трехмерные структурные особенности и геометрию. Каждый пептидомиметик может дополнительно иметь один или более уникальных дополнительных связывающих элементов.

Аптамеры представляют собой короткие олигонуклеотидные последовательности, которые можно использовать для распознавания и специфического связывания почти любой молекулы, включая белки клеточной поверхности. Метод систематической эволюции лигандов за счет экспоненциального обогащения (SELEX) является мощным и может использоваться для легкой идентификации таких аптамеров. Аптамеры можно получать для широкого диапазона белков важных для терапии и диагностики, таких как факторы роста и антигены клеточной поверхности. Эти олигонуклеотиды связывают их мишени с аналогичной аффинностью и специфичностью, что и антитела (см., например, Ulrich (2006) *Handb Exp Pharmacol* 173:305-326).

Агентом может быть антитело или его антигенсвязывающий участок (т.е. фрагмент антитела), при этом антитело или его антигенсвязывающий участок специфически связывает мишень (например, растворимую биомолекулу). Агент может содержать антитело или его антигенсвязывающий участок, при этом антитело или его антигенсвязывающий участок специфически связывает мишень (например, растворимую биомолекулу). Термин "антитело" относится к полным антителам, включая антитела разных изотипов, например, антитела IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин "антитело" включает поликлональное антитело, моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, приматизированное антитело, деиммунизированное антитело и полностью человеческое антитело, антитело может быть получено или может происходить из любого из множества видов, например, млекопитающих, таких как люди, нечеловеческие приматы (например, орангутанги, павианы или шимпанзе), лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, карликовые песчанки, хомяки, крысы и мыши. Антителом может быть очищенное или рекомбинантное антитело.

Термин "фрагмент антитела", "связывающий биомолекулу фрагмент", "антигенсвязывающий участок антитела" и аналогичные термины относятся к фрагменту антитела, который сохраняет способность связывания с антигеном-мишенью. Такие фрагменты включают, например, одноцепочечное антитело, одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), Fd фрагмент, Fab фрагмент, Fab' фрагмент или F(ab')₂ фрагмент. scFv фрагмент представляет собой одиночную полипептидную цепь, которая содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепи антитела, из которого происходит scFv. В дополнение, в определение антитела также включены интратела, минитела, триатела и диатела, которые совместимы с применением в способах, описанных в данном документе (см., например, Todorovska et al. *J Immunol Methods* 248(1):47-66 (2001); Hudson и Kortt *J Immunol Methods* 231(1):177-189 (1999); Poljak *Structure* 2 (12):1121-1123 (1994); Rondon и Marasco *Annual Review of Microbiology* 51:257-283 (1997), раскрытия каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей полноте). Термином "антитело" также охвачены биспецифические антитела (включая DVD-Ig антитела). Биспецифические антитела представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере для двух разных антигенов.

Как использовано в данном документе, термин "антитело" также включает, например, однодоменные антитела, например, верблюдьи однодоменные антитела. См. например, Muyldermans et al. *Trends Biochem Sci* 26:230-235(2001); Nuttall et al. *Curr Pharm Biotech* 1:253-263(2000); Reichmann et al. *J Immunol Meth* 231:25-38(1999); публикации заявок PCT №№ WO 94/04678 и WO 94/25591; и патенты США №№ 6005079, 6015695 и 7794981, которые все включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления в раскрытии предоставлены однодоменные антитела, содержащие два VH домена с такими модификациями, чтобы образовать однодоменные антитела.

В некоторых вариантах осуществления агентом является каркасный белок, не принадлежащий антителу. Эти белки обычно получают через основанную на комбинаторной химии адаптацию ранее существовавших лиганд- или антигенсвязывающих белков. Например, используя комбинаторную химию, можно модифицировать участок связывания человеческого трансферрина для рецептора человеческого трансферрина для создания смешанной библиотеки вариантов трансферрина, некоторые из которых обладают приобретенной аффинностью для разных антигенов (см. Ali et al. *J Biol Chem* 274:24066-24073(1999)). участок человеческого трансферрина, не вовлеченный в связывание рецептора, остается неизменным и служит в качестве каркаса, наподобие скелетных областей антител, для представления вариантных участков связывания. Затем библиотеки скринируют в качестве библиотеки антител на представляющий интерес антиген-мишень для идентификации тех вариантов, которые обладают оптимальной избирательностью и аффинностью для антигена-мишени. Каркасные белки, не принадлежащие антителу, сходные по функции с антителами, определяются как обладающие рядом преимуществ по сравнению с антителами, причем эти преимущества включают, среди прочего, повышенную растворимость и проникновение в ткань, менее дорогостоящее производство и легкую конъюгацию с другими представляющий интерес молекулами (см. Hey et al. *TRENDS Biotechnol* 23(10):514-522(2005)).

Специалисту в данной области должно быть понятно, что каркасный участок каркасного белка, не принадлежащего антителу, может содержать, например, весь или часть: Z домена белка A S. aureus, человеческого трансферрина, десятого домена фибронектина человека III типа, домена куница ингибитора трипсина человека, CTLA-4 человека, белка с анкириновым повтором, липокалина человека, кристаллина человека, убиквитина человека или ингибитора трипсина из *E. elaterium* (см. Hey et al. *TRENDS Biotechnol* 23 (10):514-522 (2005)).

В некоторых вариантах осуществления агентом является естественный лиганд биомолекулы-мишени. Например, агентом может быть цитокин. Как использовано в данном документе, термин "цитокин" относится к любому секреторному полипептиду, который влияет на функции клеток, и представляет собой молекулу, которая модулирует взаимодействия между клетками при иммунном, воспалительном или гематопозитическом ответе. Цитокин включает, но без ограничения, монокины и лимфокины, независимо от того, какие клетки их продуцируют. Например, обычно упоминают, что монокин продуцируется и секретируется моноядерной клеткой, например, макрофагом и/или моноцитом. Однако многие другие клетки также вырабатывают монокины, например, естественные клетки-киллеры, фибробла-

сты, базофилы, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, астроциты головного мозга, стромальные клетки костного мозга, эпидермальные кератиноциты и В-лимфоциты. Обычно упоминают, что лимфокины продуцируются клетками-лимфоцитами. Примеры цитокинов включают, но без ограничения, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и фактор некроза опухоли бета (TNF β).

В некоторых вариантах осуществления агентом является лиганд семейства факторов некроза опухоли (TNF), например лиганд семейства TNF выбирают из TNF α , TNF β , лиганда Fas, лимфотоксина, лимфотоксина альфа, лимфотоксина бета, лиганда 4-1BB, лиганда CD30, EDA-A1, LIGHT (TNFSF14), TNF-подобного лиганда 1A (TL1A), TNF-подобного слабого индуктора апоптоза (TWEAK) и индуцирующего апоптоз лиганда семейства TNF (TRAIL). Агентом может быть лиганд CD40, лиганд CD27, лиганд OX40, фактор активации В-клеток (BAFF; TNFSF13B; BLYS), эктодисплазин А (EDA), индуцируемый при активации лиганд рецептора семейства TNFR (AITRL), ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL) или активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL). В некоторых вариантах осуществления мишенью является TNF α , TNF β , лиганд Fas, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин-бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TRAIL, лиганд CD40, лиганд CD27, лиганд OX40, фактор активации В-клеток (BAFF; TNFSF13B; BLYS), эктодисплазин (EDA), индуцируемый при активации лиганд рецептора семейства TNFR (AITRL), ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL) или активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL).

В некоторых вариантах осуществления агентом является вирусный белок или его участок, который специфически связывает мишень (например, растворимую форму мембранного белка). В некоторых вариантах осуществления агентом является vTNF, который представляет собой белок, способный специфически связывать TNF, который не закодирован геномом организма, содержащего TNF и рецепторы TNF. vTNF содержит TNF-связывающие белки вирусов, например, поксвирус (например, вирус оспы Yata, например, вирус Яба-подобного заболевания, вирус оспы Тана и вирус опухоли обезьян Яба; вирус коровьей оспы; вирус миксомы; и вирус мышинной оспы) и ретровирус (например, вирус пенестости обезьян). Например, vTNF может быть Crm B, Crm C, Crm D или Crm E вируса коровьей оспы, M-T2 вируса миксомы, S-T2 вируса пенестости обезьян, VCD30 вируса коровьей оспы или TPV2L вируса оспы Тана. В некоторых вариантах осуществления агентом является E6 или E7 папилломавируса человека, который связывает TNFR1, или ортолог TRAILR2, CAR1 вируса саркомы и лейкоза птиц, который связывает TNFR.

В некоторых вариантах осуществления агентом является вариант естественного лиганда для биомолекулы-мишени, например, вариант полипептида интерлейкина, такой как вариант IL-2 или вариант TNF α . Варианты, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, могут содержать одну или более замен, делеций или вставок аминокислот. Замены могут быть консервативными или неконсервативными. Как использовано в данном документе, термин "консервативная замена" относится к замене аминокислоты, имеющейся в нативной последовательности данного полипептида с существующей или не существующей в природе аминокислотой, имеющей сходные стерические свойства. Когда боковая цепь нативной аминокислоты, подлежащей замене, является либо полярной, либо гидрофобной, консервативная замена должна быть с существующей в природе аминокислотой или с не существующей в природе аминокислотой, которая также является полярной или гидрофобной, и необязательно, с такими же или аналогичными стерическими свойствами, как у боковой цепи замененной аминокислоты. Консервативные замены обычно включают замены в следующих группах: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; глутамин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин. Однобуквенные аббревиатуры аминокислот выглядят следующим образом: аланин (A); аргинин (R); аспарагин (N); аспарагиновая кислота (D); цистеин (C); глицин (G); глутамин (Q); глутаминовая кислота (E); гистидин (H); изолейцин (I); лейцин (L); лизин (K); метионин (M); фенилаланин (F); пролин (P); серин (S); треонин (T); триптофан (W), тирозин (Y); и валин (V). Варианты также включают фрагменты полного размера, естественные лиганды дикого типа, а также фрагменты, содержащие одну или более замен, вставок или делеций аминокислот относительно полноразмерного естественного лиганда дикого типа, из которого был получен фрагмент.

Фраза "неконсервативные замены", как использовано в данном документе, относится к замене аминокислоты, которая имеется в исходной последовательности, другой существующей или не существующей в природе аминокислотой, имеющей разные электрохимические и/или стерические свойства. Таким образом, боковая цепь замещающей аминокислоты может быть значительно больше (или меньше) чем боковая цепь замещаемой нативной аминокислоты и/или может иметь функциональные группы со значительно иными электронными свойствами, чем замещаемая аминокислота.

В некоторых вариантах осуществления вариант полипептид содержит по меньшей мере две (например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более чем 100) замен, делеций или вставок аминокислот, относительно полноразмерного полипептида дикого типа, из которого он был получен. В некоторых вариантах осуществления вариант

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

В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид (например, вариантный IL-2 или TNF α полипептид) сохраняет по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100) % способности полноразмерного полипептида дикого типа, из которого он был получен, связывания с биомолекулой-мишенью (например, с элементом пары специфического связывания, в которой элементом является полноразмерный полипептид дикого типа). В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид будет обладать большей аффинностью с биомолекулой-мишенью, чем полноразмерный полипептид дикого типа, из которого вариант был получен. Например, в некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид обладает в два (три, четыре, пять, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 или даже 1000) раз большей аффинностью с биомолекулой-мишенью, чем имеет полноразмерный полипептид дикого типа, из которого был получен вариантный полипептид. Способы обнаружения или измерения взаимодействия между двумя белками известны в данной области и описаны выше.

В некоторых вариантах осуществления полноразмерный естественный лиганд дикого типа модулирует активность рецептора клеточной поверхности. Соответственно, варианты естественных лигандов могут иметь повышенную или пониженную способность модулирования активности рецептора, относительно активности естественного лиганда дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид имеет меньше чем 90 (например, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или меньше чем 5%) способности полноразмерного полипептида дикого типа, из которого вариант был получен, активировать рецепторный белок клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид не активирует рецептор, с которым он связывается.

Такие иллюстративные варианты полипептиды известны в данной области. Например, в публикации международной патентной заявки № WO 2012/085891 описаны варианты лигандов семейства TNF, обладающие пониженной способностью к тримеризации и, таким образом, пониженной способностью активировать рецепторы семейства TNF (см. Также публикацию патентной заявки США № U.S. 2014/0096274, включенную настоящим посредством ссылки). Все же варианты лиганды TNF сохраняют способность связывания с рецепторами семейства TNF. В данной области известны подходящие способы сравнения активности между вариантными и естественными лигандами дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления растворимая биомолекула представляет собой лиганд для рецептора клеточной поверхности, например, цитокин или хемокин (например, MCP-1/CCL2, CCL5, CCL11, CCL12 или CCL19), например, любой из тех, что известны в данной области или описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления лигандом является лиганд семейства факторов некроза опухоли (TNF) или его вариант. В некоторых вариантах осуществления лигандом семейства TNF является TNF α или его вариант. В некоторых вариантах осуществления лигандом семейства TNF является лиганд Fas, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин-бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TNF β , TRAIL или вариант любого из вышеупомянутых. В некоторых вариантах осуществления лигандом является лиганд суперсемейства TGF β или его вариант, например, активин А, активин В, антимюллеровский гормон, фактор роста и дифференцировки (например, GDF1 или GDF11), костный морфогенетический белок (BMP), ингибин (например, ингибин альфа, ингибин бета), lefty, персефин, nodal, нейротурин, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 или миостатин. В некоторых вариантах осуществления лигандом является гормон (например, пептидный гормон), например, грелин.

В некоторых вариантах осуществления растворимая биомолекула представляет собой гаптоглобин или бета-2 микроглобулин.

В некоторых вариантах осуществления растворимой биомолекулой является молекула, идентифицированная в табл. 2.

Таблица 2

Иллюстративные растворимые биомолекулы и/или агенты

Первый элемент пары специфического связывания (Растворимая биомолекула или агент)	Аббревиа тура гена	Класс Молекулы	Сопутствующее болезненное состояние	Второй элемент пары специфического связывания
Фактор некроза опухоли альфа	TNF	Цитокин	AD, ожирение, диабет II типа (T2D), Альцгеймер	sTNF-R
Растворимый рецептор интерлейкина-2	IL2RA	Ловушка	Рак	IL-2, даклизумаб, базиликсимаб, инолимомаб
Грелин	GHRL	Гормон	Ожирение	рецептор Грелина (GHSR1); аутоантитела против грелина
Растворимый рецептор фактора некроза опухоли-1	TNFRSF1A	Ловушка	Рак	rtTNF
Растворимый рецептор фактора некроза опухоли-2	TNFRSF1B	Ловушка	Рак	rtTNF
Трансформирующий фактор роста beta1	LTBP1	Фактор роста	Мышечная дегенерация, дисдифференциация	
C-C мотив лиганд 11, также известный как: эозинофильный хемотактический белок, эотаксин-1	CCL11	Цитокин	Уменьшенный нейрогенез и познавательная способность	
Интерлейкин-2	IL2	Цитокин	AD	sIL-2R, бриакинумаб
Интерлейкин-6	IL6	Цитокин	AD	sIL-6R, олокизумаб, сарилумаб, силтуксимаб

Интерлейкин-8	CXCL8	Цитокин	AD	IL-8R
Интерлейкин-1A	IL1A	Цитокин	AD	sIL-1RA
Интерлейкин-1B	IL1B	Цитокин	Воспаление , диабет	канакинумаб, гевокизумаб
C-X-C мотив хемокин 10	CXCL10	Хемокин	Иммунная активация	CXCR3, элделумаб
Фактор роста и дифференцировки 8, также известный как: Миостатин	MSTN	Фактор роста	Саркопения	рецептор активина (ActRIIB)
Рецептор-ловушка-3	FAS	Ловушка	Рак	FAS-L
Растворимый рецептор смерти-4	TNFRSF10 A	Ловушка	Рак	TRAIL-R1
Растворимый рецептор смерти-5	TNFRSF10 B	Ловушка	Рак	TRAIL-R2, дрозитумаб
лиганд Fas	FASLG	Цитокин	AD	sDR3
TNF-подобный индуцирующий апоптоз лиганд	TNFSF10	Цитокин	AD, T2D	sDR4/5
лиганд 1 хемокина (C-X-C мотив) (стимулирующая рост меланомы активность, альфа)	CXCL1	Хемокин	Старение/р ак	
Амилоид бета	APP	Фрагмен т	Альцгеймер напр., а	антитела против бета амилоида, адуканимаб
β2-микроглобулин	B2M	Белок	Старение	
TNF-подобный слабый индуктор апоптоза	TNFSF12	Цитокин	TBD	sDR3
Матриксная Металлопептидаза 1 (Интерстициальная Коллагеназа)	MMP1	Протеаз а	OA/Рак	
Матриксная Металлопептидаза 2 (Желатиназа А, 72 кДа Желатиназа, 72 кДа коллагеназа IV типа)	MMP2	Протеаз а	OA/Рак	
Матриксная Металлопептидаза 3 (Стромелизин 1, Прожелатиназа)	MMP3	Протеаз а	Старение/р ак	
Матриксная Металлопептидаза 9 (Желатиназа В, 92 кДа Желатиназа, 92 кДа коллагеназа IV типа)	MMP9	Протеаз а	OA/Рак	

Матриксная Металлопептидаза 10 (Стромелизин 2)	MMP10	Протеаза	Старение/рак	
Матриксная Металлопептидаза 12 (Макрофагальная эластаза)	MMP12	Протеаза	Старение/рак	
Индолеамин 2, 3- диоксигеназа	IDO1	Фермент	Рак	
Нейрогенный локус гомолог 1 белка notch	NOTCH1	Цитокин	Дисфункция стволовых клеток	
Нейрогенный локус гомолог 2 белка notch	NOTCH2	Цитокин	Дисфункция стволовых клеток	
Нейрогенный локус гомолог 3 белка notch	NOTCH3	Цитокин	Дисфункция стволовых клеток	
Нейрогенный локус гомолог 4 белка notch	NOTCH4	Цитокин	Дисфункция стволовых клеток	
Интерлейкин-5	IL5	Цитокин	AD	Меполизумаб, резлизумаб
Растворимый рецептор интерлейкина-5	IL5RA	Ловушка	Рак	IL-5
Растворимый рецептор интерлейкина-6	IL6R	Ловушка	Рак	IL-6, тоцилизумаб
Растворимый интерлейкин-8 рецептор	CXCR1	Ловушка	Рак	IL-8
Растворимый интерлейкин-1A рецептор	IL1R1	Ловушка	Рак	IL-1A
C-Реактивный белок	CRP	Белок	Маркер воспаления	
Гаптоглобин	HP	Белок		
Альфа Цепь Фибриногена	FGA	Белок	Заболевание сердца	
Растворимый рецептор смерти-3	TNFRSF25	Ловушка		TWEAK
CD47	CD47	Белок	Рак	тромбоспондин- 1; сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPα)

"AD" относится к аутоиммунным расстройствам и/или воспалительным расстройствам. "OA" относится к остеоартриту.

В некоторых вариантах осуществления агент может связываться (например, специфически связываться) с биомолекулой, выбранной из TNF α , TNF β , растворимого рецептора TNF, растворимого TNFR-1, растворимого TNFR-2, лимфотоксина, лимфотоксина альфа, лимфотоксина бета, лиганда 4-1BB, лиганда CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TRAIL, растворимого рецептора TRAIL, IL-1, растворимого рецептора IL-1, IL-1A, растворимого рецептора IL-1A, IL-1B, растворимого рецептора IL-1B, IL-2, растворимого рецептора IL-2, IL-5, растворимого рецептора IL-5, IL-6, растворимого рецептора IL-6, IL-8, IL-10, растворимого рецептора IL-10, CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CX3CL1, лиганда FAS, растворимого рецептора смерти-3, растворимого рецептора смерти-4, растворимого рецептора смерти-5, TNF-подобного слабого индуктора апоптоза, mMP1, mMP2, mMP3, mMP9, mMP10, mMP12, CD28, растворимого члена семейства B7, растворимого CD80/B7-1, растворимого CD86/B7-2, растворимого CTLA4, растворимого PD-L1, растворимого PD-1, растворимого Tim3, Tim3L, галектина 3, галектина 9, растворимого CEACAM1, растворимого LAG3, TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, антимюллеровского гормона,

артемина, глиального клеточного нейротрофического фактора (GDNF), костного морфогенетического белка (например, BMP2, BMP3, BMP3B, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, BMP10, BMP11, BMP12, BMP13, BMP15), фактора роста и дифференцировки (например, GDF1, GDF2, GDF3, GDF3A, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF15), ингибина альфа, ингибина бета (например, ингибина бета A, B, C, E), lefty, nodal, нейротурин, персефин, миостатин, грелин, sLR11, CCL2, CCL5, CCL11, CCL12, CCL19, интерферона альфа, интерферона бета, интерферона гамма, кластерина, VEGF-A, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), гранулоцитарно- макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), простагландина E2, фактора роста гепатоцитов, фактора роста нервов, склеростин, комплемента C5, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, PCSK9, амилоид бета, активин, активин A, активин B, β 2-микроглобулин, растворимый NOTCH1, растворимый NOTCH2, растворимый NOTCH3, растворимый NOTCH4, растворимый Jagged1, растворимый Jagged2, растворимый DLL1, растворимый DLL3, растворимый DLL4, гаптоглобин, альфа цепи фибриногена, кортикотропин-высвобождающего фактора, кортикотропин- высвобождающего фактора 1 типа, кортикотропин-высвобождающего фактора 2 типа, уркортин 1, уркортин 2, уркортин 3, CD47, аутоантитела против интерферона γ , аутоантитела против интерлейкина 6, аутоантитела против интерлейкина 17, аутоантитела против грелина, wnt, индолеамин 2,3-диоксигеназы, C-реактивного белка, ВИЧ-1 gp120, эндотоксина, токсина эпсилон Clostridium perfringens, энтеротоксина B Staphylococcus и ботулинического токсина.

В некоторых вариантах осуществления агент может содержать антитело (или его антигенсвязывающий участок), которое специфически связывает TNF α , TNF β , растворимый рецептор TNF, растворимый TNFR-1, растворимый TNFR-2, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TRAIL, растворимый рецептор TRAIL, IL-1, растворимый рецептор IL-1, IL-1A, растворимый рецептор IL-1A, IL-1B, растворимый рецептор IL-1B, IL-2, растворимый рецептор IL-2, IL-5, растворимый рецептор IL-5, IL-6, растворимый рецептор IL-6, IL-8, IL-10, растворимый рецептор IL-10, CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CX3CL1, лиганд FAS, растворимый рецептор смерти-3, растворимый рецептор смерти-4, растворимый рецептор смерти-5, TNF-подобный слабый индуктор апоптоза, mMP1, mMP2, mMP3, mMP9, mMP10, mMP12, CD28, растворимый член семейства B7, растворимый CD80/B7-1, растворимый CD86/B7-2, растворимый CTLA4, растворимый PD-L1, растворимый PD-1, растворимый Tim3, Tim3L, галектин 3, галектин 9, растворимый CEACAM1, растворимый LAG3, TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, антимюллеровский гормон, артемин, глиальный клеточный нейротрофический фактор (GDNF), костный морфогенетический белок (например, BMP2, BMP3, BMP3B, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B, BMP10, BMP11, BMP12, BMP13, BMP15), фактор роста и дифференцировки (например, GDF1, GDF2, GDF3, GDF3A, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF15), ингибин альфа, ингибин бета (например, ингибин бета A, B, C, E), lefty, nodal, нейротурин, персефин, миостатин, грелин, sLR11, CCL2, CCL5, CCL11, CCL12, CCL19, интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, кластерин, VEGF-A, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно- макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), простагландин E2, фактор роста гепатоцитов, фактор роста нервов, склеростин, комплемент C5, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, PCSK9, амилоид бета, активин, активин A, активин B, β 2-микро глобулин, растворимый NOTCH1, растворимый NOTCH2, растворимый NOTCH3, растворимый NOTCH4, растворимый Jagged1, растворимый Jagged2, растворимый DLL1, растворимый DLL3, растворимый DLL4, гаптоглобин, альфа цепь фибриногена, кортикотропин-рилизинг-фактор, кортикотропин-рилизинг-фактор 1 типа, кортикотропин рилизинг-фактор 2 типа, уркортин 1, уркортин 2, уркортин 3, CD47, аутоантитело против интерферона γ , аутоантитело против интерлейкина 6, аутоантитело против интерлейкина 17, аутоантитело против грелина, wnt, индолеамин 2,3-диоксигеназу, C-реактивный белок, ВИЧ-1 gp120, эндотоксин, токсин эпсилон Clostridium perfringens, энтеротоксин B Staphylococcus или ботулинический токсин.

Агент может содержать ипилимумаб, пембролизумаб, ниволумаб, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб (например, цертолизумаб пегол), голимумаб, этанерцепт, стамуламаб, фрезолимуамаб, метелимуамаб, демцизуамаб, тарекстуамаб, бронтиктузуамаб, меполизумаб, урелумаб, канакинуамаб, даклизуамаб, белимуамаб, деносуамаб, экулизумаб, тоцилизумаб, атлизумаб, устекинуамаб, паливизумаб, адуканиамаб, бевацизумаб, бролуцизуамаб, ранибизумаб, афлиберсепт, актоксуамаб, эсилимоамаб, силтуксуамаб, афелимоамаб, нерелимоамаб, озорализумаб, патеклизумаб, сирукуамаб, омализумаб, адуканиамаб, бапинеузуамаб, кренезумаб, гантенерумаб, понезумаб, соланезумаб, дапирилизумаб, руплизумаб, торализумаб, энотикуамаб, алацизуамаб, цетуксуамаб, футуксуамаб, икрукуамаб, имгатузуамаб, матузуамаб, нецитумумаб, нимотузуамаб, панитумумаб, рамуцируамаб, залутумумаб, дулиготумаб, патритумаб, эртумаксуамаб, пертузуамаб, трастузуамаб, алирокуамаб, анрукинзуамаб, диридавуамаб, дрозитуамаб, дупилумаб, дузигитумаб, экулизумаб, эдобакоамаб, эфунгуамаб, элделумаб, эноблитузуамаб, энокизумаб, эвинакуамаб, эволокуамаб, эксбивирумаб, эксбивирумаб, фазинуамаб, фелвизумаб, фезакинуамаб, фиклатузуамаб, фиривуамаб, флетикуамаб, форалумаб, форавируамаб, фулранумаб, фаликсуамаб, ганитумаб, гевокизумаб, фузелкуамаб, идаруцизуамаб, ималумаб, инолимоамаб, иратумумаб, иксекизуамаб, лампализуамаб, лебрикизуамаб, лензилумаб, лер-

делимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лигелизумаб, лоделцизумаб, лулизумаб, мапатумумаб, мотавизумаб, намилиумаб, небакумаб, несвакумаб, обилтоксаксимаб, олокизумаб, ортикумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панобакумаб, пасколизумаб, перакизумаб, пидилизумаб, пекселизумаб, притоксаксимаб, квиллизумаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, резлизумаб, рилотумумаб, ромозозумаб, ронгализумаб, сарилумаб, секукинумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб, тализумаб, танезумаб, тефибазумаб, TGN1412, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тозатоксумаб, тралокинумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тувирумаб, уртоксазумаб, вантистумаб, вануцизумаб или антигенсвязывающий участок любого из упомянутых выше.

В некоторых вариантах осуществления агент содержит $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, растворимый рецептор TNF , растворимый TNFR-1 , растворимый TNFR-2 , vTNF , лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TRAIL, растворимый рецептор TRAIL, IL-1, растворимый рецептор IL-1, IL-1A, растворимый рецептор IL-1A, IL-1B, растворимый рецептор IL-1B, IL-2, растворимый рецептор IL-2, IL-5, растворимый рецептор IL-5, IL-6, растворимый рецептор IL-6, IL-8, IL-10, растворимый рецептор IL-10, CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CX3CL1, лиганд FAS, растворимый рецептор смерти-3, растворимый рецептор смерти-4, растворимый рецептор смерти-5, TNF -подобный слабый индуктор апоптоза, mMP1 , mMP2 , mMP3 , mMP9 , mMP10 , mMP12 , CD28, растворимый член семейства B7, растворимый CD80/B7-1, растворимый CD86/B7-2, растворимый CTLA4, растворимый PD-L1, растворимый PD-1, растворимый Tim3, Tim3L, галектин 3, галектин 9, растворимый CEACAM1, растворимый LAG3, $\text{TGF-}\beta$, $\text{TGF-}\beta 1$, $\text{TGF-}\beta 2$, $\text{TGF-}\beta 3$, sLR11, CCL2, CCL5, CCL11, CCL12, CCL19, активин, активин A, активин B, растворимый NOTCH1, растворимый NOTCH2, растворимый NOTCH3, растворимый NOTCH4, растворимый Jagged1, растворимый Jagged2, растворимый DLL1, растворимый DLL3, растворимый DLL4 или гаптоглобин.

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

X. Способы получения антитела.

Как отмечалось выше, в некоторых вариантах осуществления агенты, иммобилизованные на поверхности частицы или частиц, представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Выработку антител можно вызывать с помощью способов, известных в данной области. Например, млекопитающих, таких как мышь, хомяка или кролика, можно иммунизировать иммуногенной формой биомолекулы (например, растворимым TNFR , токсином или вирусным белком). В качестве альтернативы, иммунизация может проходить с использованием нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует *in vivo* биомолекулу (например, растворимый белок), вызывающую наблюдаемый иммуногенный ответ. Методики придания иммуногенности белку или пептиду включают конъюгацию с носителями или другие методики, хорошо известные в данной области. Например, пептидиловый участок полипептида изобретения можно вводить в присутствии адъюванта. Процесс иммунизации можно отслеживать путем выявления титров антител в плазме или сыворотке. Для оценки концентраций антител можно использовать стандартный ELISA или другие иммуноанализы с иммуногеном в качестве антигена.

После иммунизации может быть получена антисыворотка, реагирующая с полипептидом изобретения, и при необходимости, поликлональные антитела, выделенные из сыворотки. Для получения моноклональных антител от иммунизированного животного можно получить продуцирующие антитела клетки (лимфоциты) и слить с помощью методики слияния стандартных соматических клеток с иммортализованными клетками, например, миеломными клетками, с получением клеток гибридомы. Такие методики хорошо известны в данной области и включают, например, гибридную методику (первоначально разработанную Kohler и Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), в качестве гибридной методики В-клеток человека (Kozbar et al. (1983) *Immunology Today*, 4: 72), и EBV-гибридную методику для получения человеческих моноклональных антител (Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Клетки гибридомы можно иммунохимически скринировать на получение антител, специфически реагирующих с полипептидами изобретения и выделенными моноклональными антителами.

XI. Иммобилизации агента на частице.

Агент может быть иммобилизован на поверхности частицы посредством ковалентной связи или нековалентной связи, например, посредством ионной связи, водородной связи, гидрофобной связи, координации, слипания или физической абсорбции или взаимодействия.

Частица может содержать реакционноспособную группу, например, для иммобилизации агента. Частица может содержать от приблизительно 10 до приблизительно 10^9 реакционноспособных групп, например, от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^8 реакционноспособных групп, от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^7 реакционноспособных групп или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 реакционноспособных групп. Частица может содержать множество реакционноспособных групп. Например, множество реакционноспособных групп может включать от приблизительно 10 до прибли-

тельно 10^9 реакционноспособных групп, например, от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^8 реакционноспособных групп, от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^7 реакционноспособных групп или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 реакционноспособных групп.

Известны способы добавления реакционноспособных групп множеству частиц разных типов (см., например, Xu, Z. et al. *J Nanoparticle Research* 17:56 (2015); Yu, M.K. et al. *Theranostics* 2(1):3 (2012); Sanz, V. et al. *J Nanoparticle Research* 14:917 (2012); Jokerst, J.V. et al. *Nanomedicine* 6(4):715 (2011); Guan, B. et al. *Langmuir* 27(1):328 (2011); Cheng, K. et al. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2(9):2489 (2010); Godin, B. et al. *J Biomed Mater Res A* 94(4):1236 (2010); Cauda, V. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 131(32):11361 (2009); Kecht, J. et al. *Chemistry of Materials* 20(23):7207 (2008); Boisselier, E. et al. *Chemical Communications* 30(44):5788 (2008); Sun, X.-L. et al. *Bioconjugate Chemistry* 17(1):52 (2006), каждая из которых включена настоящим посредством ссылки во всей своей полноте).

Каждая реакционноспособная группа может избирательно реагировать с предварительно определенной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа может образовывать связь с агентом, как описано в данном документе, которая может содержать (например, путем соединения посредством линкера) функциональную группу, способную реагировать, предпочтительно избирательно реагировать, с реакционноспособными группами (фиг. 7). В некоторых вариантах осуществления агент, как описано в данном документе, может образовывать связь с реакционноспособной группой. В некоторых вариантах осуществления каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп может образовывать связь с агентом, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления каждый агент из множества агентов может образовывать связь с реакционноспособной группой. Связь может представлять собой ковалентную связь или нековалентную связь. Примеры нековалентных связей включают спаривание оснований комплементарных нуклеотидов в нуклеотидной последовательности (например, при этом реакционноспособная группа содержит нуклеиновую кислоту), комплексы включения (например, между циклодекстриновым кольцом и неполярным фрагментом) и биотиновые комплексы (например, с авидином, стрептавидином, нейтравидином и их мономерными формами). Частица может содержать множество агентов (которые могут быть одинаковыми или разными), соединенных с частицей, например, через реакционноспособные группы при этом каждый агент связан с реакционноспособной группой прямо или опосредованно.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу получения частицы, как описано в данном документе, включающему инкубирование незагруженной частицы (например, частицы, содержащей одну или более реакционноспособных групп) с агентом изобретения (например, соединенным, если необходимо, с функциональной группой, способной реагировать с реакционноспособными группами), образующим посредством этого связь между частицей (например, реакционноспособной группой частицы) и агентом. В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубирование незагруженной частицы (например, частицы, содержащей множество реакционноспособных групп) с множеством агентов, которые могут быть одинаковыми или разными, образуя посредством этого связи между частицей (например, совокупностью реакционноспособных групп частицы) и совокупностью агентов.

Частица может содержать линкер, например, для связывания агента с реакционноспособной группой. Частица может содержать от приблизительно 10 до приблизительно 10^9 линкеров, например, от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^8 линкеров, от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^7 линкеров или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 линкеров. Частица может содержать множество линкеров. Например, множество линкеров может включать от приблизительно 10 до приблизительно 10^9 линкеров, например, от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^8 линкеров, от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^7 линкеров или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 линкеров.

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа и/или агент изобретения может образовывать связь с линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер может образовывать связь с реакционноспособной группой и/или агентом. В некоторых вариантах осуществления каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп может образовывать связь с линкером. В некоторых вариантах осуществления каждый агент из множества агентов может образовывать связь с линкером. В некоторых вариантах осуществления каждый линкер из множества линкеров может образовывать связь с реакционноспособной группой. В некоторых вариантах осуществления каждый линкер из множества линкеров может образовывать связь с агентом. Связь может представлять собой ковалентную связь или нековалентную связь. В некоторых вариантах осуществления частица содержит линкер. Линкер может быть связан с реакционноспособной группой. В некоторых вариантах осуществления частица содержит множество линкеров. Например, частица может содержать множество реакционноспособных групп и множество линкеров, например, при этом каждый линкер из множества линкеров связан с реакционноспособной группой из множества реакционноспособных групп. Частица может содержать множество реакционноспособных групп, множество линкеров и множество агентов, например, при этом каждый агент связан с линкером, и/или каждый линкер связан с реакционноспособной группой.

Линкер может содержать функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа и/или агент изобретения может образовывать связь с функциональной группой. В

некоторых вариантах осуществления функциональная группа может образовывать связь с реакционноспособной группой, например, с образованием амида или сложного эфира, когда карбоксилат и амин или спирт реагируют, или амина или тиоэфира, когда амин или тиол реагирует с малеимидом или другим акцептором Михаэля. В некоторых вариантах осуществления каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп может образовывать связь с функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления каждая функциональная группа из множества функциональных групп может образовывать связь с реакционноспособной группой. Связь может представлять собой ковалентную связь или нековалентную связь. В некоторых вариантах осуществления частица содержит функциональную группу.

Функциональная группа может быть связана с реакционноспособной группой, например, представленной в виде амида, сложного эфира, амина, тиоэфира или другого продукта реакции функциональной группы и реакционноспособной группы. В некоторых вариантах осуществления частица содержит множество функциональных групп. Например, частица может содержать множество реакционноспособных групп и множество функциональных групп, например, при этом каждая функциональная группа из множества функциональных групп связана с реакционноспособной группой из множества реакционноспособных групп, например, представленной в виде амида, сложного эфира, амина, тиоэфира или другого продукта реакции функциональной группы и реакционноспособной группы. Частица может содержать множество реакционноспособных групп, множество функциональных групп и множество агентов, например, при этом каждый агент связан с функциональной группой, и/или каждая функциональная группа связана с реакционноспособной группой. Конечно, нет необходимости, чтобы каждая реакционноспособная группа частицы была соединена с функциональной группой/агентом, при условии, что множество этих реакционноспособных групп соединены с функциональными группами/агентами для придания частице необходимых функций.

Линкер может содержать первую функциональную группу и вторую функциональную группу. Первая функциональная группа может быть способна избирательно реагировать с агентом, несущим заданный фрагмент, способный реагировать с первой функциональной группой. Вторая функциональная группа может быть способна избирательно реагировать с реакционноспособными группами частиц. Первой функциональной группой и/или второй функциональной группой может быть, например, алкен, галогенированный алкил, алкин, амин, арилизид, арилгаллиды, азид, карбодиимид, карбоксил, диен, диенофил, глиоксаль, галоацил, имидоэфир, изоцианид, малеимид, N-гидроксисукцинимидиловый (NHS) сложный эфир, фосфин, тетразин, тиол или нуклеиновая кислота.

Линкером может быть, например, сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), поли(этиленгликоль) (N-гидроксисукцинимид 5-пентаноат) эфир N'-(3-малеимидопропионил)аминоэтан (NHS-PEG-MAL), сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) или сукцинимидил иодоацетат (SIA) (см., например, Yu, M.K. et al. *Theranostics* 2(1):3 (2012)).

Линкер может содержать первую функциональную группу и вторую функциональную группу, при этом либо первой функциональной группой является амин, а второй функциональной группой является карбоновая кислота, либо первой функциональной группой является карбоновая кислота, а второй функциональной группой является амин. Частица может содержать множество функциональных групп, при этом функциональными группами являются первичные аминогруппы.

Частицей может быть частица кремнезема, или частица, содержащая кремнеземную поверхность (например, кремниевая частица, имеющая окисленную поверхность, или частица, имеющая некремнеземную сердцевину и кремнеземный внешний слой). Частица может содержать золотую поверхность (например, частицей может быть золотая частица, или она может иметь золотую поверхность, покрывающую сердцевину, содержащую иной материал). Частица может содержать полимерную поверхность (например, частица может представлять собой полимерную частицу или иметь полимерную поверхность, покрывающую сердцевину, содержащую иной материал).

Поверхность имеющей покрытие частицы может быть непрерывной поверхностью (например, покрывающей по существу всю поверхность частицы), или прерывистой поверхностью (например, покрывающей участок или участки поверхности частицы).

Каждой реакционноспособной группой частицы может быть золото, которое может связывать, например, тиольную функциональную группу. Вследствие этого, линкер или агент может содержать тиол. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит тиол (например, при этом тиол является функциональной группой) и карбоновую кислоту. Частица может содержать аминную реакционноспособную группу (например, множество аминных реакционноспособных групп). Например, частицей может быть кремнеземная частица, или она может содержать кремнеземную поверхность, и частица может содержать множество реакционноспособных групп, при этом каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп представляет собой амин. Частицей может быть полимерная частица, или она может содержать полимерную поверхность, и частица может содержать множество реакционноспособных групп, при этом каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп представляет собой амин.

Реакционноспособная группа может содержать ароматический гидразин (например, 6-гидразино-никотиновую кислоту), а функциональная группа может содержать ароматический альдегид (например, 4-формилбензоат), или реакционноспособная группа может содержать ароматический альдегид (например, 4-формилбензоат), и функциональная группа может содержать ароматический гидразин (например, 6-гидразино-никотиновую кислоту), например, обеспечивая посредством этого реакционноспособную группу для связывания функциональной группы в присутствии анилина (см., например, U.S. 2014/0302001, включенный настоящим посредством ссылки во всей своей полноте, и <http://www.solulink.com/solulink-technology>).

Частица может содержать множество реакционноспособных групп, при этом каждая реакционноспособная группа содержит карбоновую кислоту, функциональная группа может содержать амин, реакционноспособная группа может быть перекрестно сшита с функциональной группой, например, с использованием карбодиимида (например, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, дициклогексилкарбодиимид, диизопропилкарбодиимид), необязательно, с использованием триазола (например, 1-гидрокси-бензотриазола, 1-гидрокси-7-аза-бензотриазола) или N-гидроксисукцинимидилового сложного эфира (например, N-гидроксисукцинимидила).

Частица может содержать золото или золотую поверхность (например, покрывающую кремнезем). Реакционноспособной группой или множеством реакционноспособных групп может быть золото, а функциональной группой или множеством функциональных групп могут быть тиолы (например, функциональной группой линкера или агента может быть тиол). Например, агент может содержать цистеин, например, при этом функциональной группой является тиол цистеина.

Частица может содержать множество реакционноспособных групп, при этом каждая реакционноспособная группа содержит малеимид. функциональная группа может содержать тиол (например, функциональная группа линкера или агента), обеспечивая посредством этого функциональную группу для связывания малеимида частицы. Например, агент может содержать цистеин, например, при этом функциональной группой является тиол цистеина.

Частица может содержать множество реакционноспособных групп, при этом каждая реакционноспособная группа содержит тиол. функциональная группа может содержать малеимид (например, функциональная группа линкера или агента), обеспечивая посредством этого функциональную группу для связывания тиола частицы.

Частица может содержать первый линкер и второй линкер, например, при этом первый линкер предназначен для связывания первого агента с реакционноспособной группой, а второй линкер предназначен для связывания второго агента с реакционноспособной группой. Частица может содержать первое множество линкеров и второе множество линкеров. Первое множество линкеров и/или второе множество линкеров может содержать от приблизительно 10^0 до приблизительно 10^9 линкеров, например, от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^8 линкеров, от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^7 линкеров или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 линкеров.

Частица может содержать первую реакционноспособную группу и вторую реакционноспособную группу, например, при этом первая реакционноспособная группа предназначена для связывания первой функциональной группы, а вторая реакционноспособная группа предназначена для связывания второй функциональной группы. Частица может содержать первое множество реакционноспособных групп и второе множество реакционноспособных групп. Первое множество реакционноспособных групп и/или второе множество реакционноспособных групп может содержать от приблизительно 10^0 до приблизительно 10^9 реакционноспособных групп, например, от приблизительно 10^2 до приблизительно 10^8 реакционноспособных групп, от приблизительно 10^3 до приблизительно 10^7 реакционноспособных групп или от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^6 реакционноспособных групп. Первая реакционноспособная группа (или множество реакционноспособных групп) может предназначаться для связывания агента с частицей, например, путем связывания функциональной группы либо агента, либо линкера с реакционноспособной группой. Вторая реакционноспособная группа (или множество реакционноспособных групп) может предназначаться для связывания второго агента с частицей, например, путем связывания либо второго агента, либо функциональной группы линкера (например, второго линкера), что можно использовать для связывания второго агента с частицей.

Первая реакционноспособная группа может отличаться от второй реакционноспособной группы, например, тем, что первая реакционноспособная группа может связывать первую функциональную группу, а вторая реакционноспособная группа может связывать вторую функциональную группу, которая отличается от первой функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления первая реакционноспособная группа является родственной со второй реакционноспособной группой, например, так, что первая реакционноспособная группа и вторая реакционноспособная группа связывают одну и ту же функциональную группу. Когда первая реакционноспособная группа и вторая реакционноспособная группа связывают одну и ту же функциональную группу, по меньшей мере одна из первой реакционноспособной группы и второй реакционноспособной группы может быть связана с защищающей группой. В этом варианте осуществления первая реакционноспособная группа может быть соединена с функциональной группой первого агента или линкера для связывания агента, например, вторая реакционно-

собная группа может быть лишена защиты, а затем вторая реакционноспособная группа может быть соединена со вторым агентом.

Защитные группы хорошо известны (Greene, T.W. and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York (1999), включенное настоящим посредством ссылки во всей своей полноте), и иллюстративные группы приведены ниже.

Аминозащитные группы включают метилкарбамат, этилкарбамат, 9-флуоренилметилкарбамат (Fmoc), 9-(2-сульфо)флуоренилметилкарбамат, 9-(2,7-дибромо)фторенилметилкарбамат, 2,7-ди-трет-бутил-[9-10,10-диоксо-10,10,10,10-тетрагидротиоксантил]метилкарбамат (DBD-Tmoc), 4-метоксифенилкарбамат (Phenc), 2,2,2-трихлорэтилкарбамат (Troc), 2-триметилсилилэтилкарбамат (Teoc), 2-фенилэтилкарбамат (hZ), 1-(1-адамантил)-1-метилэтилкарбамат (Adroc), 1,1-диметил-2-галозилкарбамат, 1,1-диметил 1-2,2-дибромоэтилкарбамат (DB-BOC), 1,1-диметил-2,2,2-трихлорэтилкарбамат (TCBOC), 1-метил-1-(4-бифенил)этилкарбамат (Broc), 1-(3,5-ди-трет-бутилфенил)-1-метилэтилкарбамат (трет-Bumeoc), 2-(2'- и 4'-пиридил)этилкарбамат (Pyoc), 2-(N1N-дициклогексилкарбоксамидо)этилкарбамат, трет-бутилкарбамат (BOC), 1-адамантилкарбамат (Adoc), винилкарбамат (Voc), аллилкарбамат (Alloc), 1-изопропилаллилкарбамат (Iraoc), циннамилкарбамат (Coc), 4-нитроциннамилкарбамат (Noc), 8-квинолилкарбамат, гидроксиперидинилкарбамат, алкилдитиокарбамат, бензилкарбамат (Cbz), метоксibenзилкарбамат (Moz), p-нитробензилкарбамат, бромбензилкарбамат, p-хлорбензилкарбамат, 2,4-дихлорбензилкарбамат, 4-метилсульфинилбензилкарбамат (MsZ), 9-антриметилкарбамат, дифенилметилкарбамат, 2-метилтиоэтилкарбамат, 2-метилсульфонилэтилкарбамат, 2-(p-толуенсульфонил)этилкарбамат, [2-(1,3-дителил)]метилкарбамат (Dmoc), 4-метилтиофенилкарбамат (Mtpc), 2,4-диметилтиофенилкарбамат (Bmpc), 2-фосфоноэтилкарбамат (Peoc), 2-трифенилфосфоноизопропилкарбамат (Pproc), 1,1-диметил-2-цианоэтилкарбамат, m-хлор-p-ацилоксибензилкарбамат, (дигидроксисорил)бензилкарбамат, 5-бензизоксазолилметилкарбамат, 2-(трифторметил)-6-хромонилметилкарбамат (Tsgoc), m-нитрофенилкарбамат, 3,5-диметоксибензилкарбамат, o-нитробензилкарбамат, 3,4-диметокси-6-нитробензилкарбамат, фенил(o-нитрофенил)метилкарбамат, производное фенотиазинил-(10)-карбонила, производное N'-p-толуенсульфониламинокарбонила, производное N-фениламинотиокарбонила, трет-амилкарбамат, S-бензилтиокарбамат, цианобензилкарбамат, циклобутилкарбамат, циклогексилкарбамат, цикlopентилкарбамат, циклопропилметилкарбамат, дециклоксibenзилкарбамат, 2,2-диметоксикарбонилвинилкарбамат, o-(N,N-диметилкарбоксамидо)бензилкарбамат, 1,1-диметил-3-(N,N-диметилкарбоксамидо)пропилкарбамат, 1,1-диметилпропинилкарбамат, ди(2-пиридил)метилкарбамат, 2-фуранилметилкарбамат, 2-иодоэтилкарбамат, изоборнилкарбамат, изобутилкарбамат, изоникотинилкарбамат, p-(p-метоксифенилазо)бензилкарбамат, 1-метилциклобутилкарбамат, 1-метилциклогексилкарбамат, 1-метил-1-циклопропилметилкарбамат, 1-метил-1-(3,5-диметоксифенил)этилкарбамат, 1-метил-1-(p-фенилазофенил)этилкарбамат, 1-метил-1-фенилэтилкарбамат, 1-метил-1-(4-пиридил)этилкарбамат, фенилкарбамат, (фенилазо)бензилкарбамат, 2,4,6-три-трет-бутилфенилкарбамат, 4-(триметиламоний)бензилкарбамат, 2,4,6-триметилбензилкарбамат, формамид, ацетамид, хлорацетамид, трихлорацетамид, трифторацетамид, фенилацетамид, 3-фенилпропанамид, пиколинамид, 3-пиридилкарбоксамида, производное N-бензоилфенилаланила, бензамид, фенилбензамид, o-нитрофенилацетамид, o-нитрофеноксиацетамид, ацетоацетамид, (N'-дителилоксикарбониламино)ацетамид, 3-(p-гидроксифенил)пропанамид, 3-(o-нитрофенил)пропанамид, 2-метил-2-(o-нитрофенокси)пропанамид, 2-метил-2-(o-фенилазофенокси)пропанамид, 4-хлорбутанамид, 3-метил-3-нитробутанамид, o-нитроциннамид, производное N-ацетилметионина, o-нитробензамид, o-(бензоилоксиметил)бензамид, 4,5-дифенил-3-оксазолин-2-он, N-фталимид, N-дителиасукцинимид (Dts), N-2,3-дифенилмалеимид, N-2,5-диметилпиррол, N-1,1,4,4-тетраметилдисирилазациклопентановый аддукт (STABASE), 5-замещенный 1,3-диметил-1,3,5-триазадициклогексан-2-он, 5-замещенный 1,3-добензил-1,3,5-триазадициклогексан-2-он, 1-замещенный 3,5-динитро-4-пиридон, N-метиламин, N-аллиламин, N-[2-(триметилсилил)этокси]метиламин (SEM), N-3-ацетоксипропиламин, N-(1-изопропил-4-нитро-2-оксо-3-пироллин-3-ил)амин, соли четвертичного аммония, N-бензиламин, N-ди(4-метоксифенил)метиламин, N-5-добензосубериламин, N-трифенилметиламин (Tr), N-[(4-метоксифенил)дифенилметил]амин (MMTr), N-9-фенилфлуорениламин (PhF), N-2,7-дихлор-9-флуоренилметиленамин, N-ферросенилметиламино (Fern), N-2-пиколиламино N'-оксид, N-1,1-диметилтиометиленамин, N-бензилиденамин, N-метоксибензилиденамин, N-дифенилметиленамин, N-[(2-пиридил)мезитил]метиленамин, N-(N',N'-диметиламинометиленамин), N,N-изопропилидендиамин, нитробензилиденамин, N-салицилиденамин, N-5-хлорсалицилиденамин, N-(5-хлор-2-гидроксифенил)фенилметиленамин, N-циклогексиденамин, N-(5,5-диметил-3-оксо-1-циклогексенил)амин, производное N-борана, производное N-дифенилбориновой кислоты, N-[фенил(пентакарбонилхромий-ор вольфрам)карбонил]амин, хелат N-меди, хелат N-цинка, N-нитроамин, N-нитрозоамин, N-оксид амина, дифенилфосфинамид (Dpp), диметилтиофосфинамид (Mpt), дифенилтиофосфинамид (Ppt), диалкилфосфорамидаты, дибензилфосфорамидат, дифенилфосфорамидат, бензенсульфенамид, o-нитробензенсульфенамид (Nps), 2,4-динитробензенсульфенамид, пентахлорбензенсульфенамид, 2-нитро-4-метоксибензенсульфенамид, трифенилметилсульфенамид, 3-нитропиридинсульфенамид (Npys), толуенсульфонамид (Ts), бензенсульфонамид, 2,3,6-триметил-4-

метоксибензенсульфонамид (Mtr), 2,4,6-триметоксибензенсульфонамид (Mtb), 2,6-диметил-4-метоксибензенсульфонамид (Pme), 2,3,5,6-тетраметил-4-метоксибензенсульфонамид (Mte), 4-метоксибензенсульфонамид (Mbs), 2,4,6-триметилбензенсульфонамид (Mts), 2,6-диметокси-4-метилбензенсульфонамид (iMds), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонамид (Pmc), метансульфонамид (Ms), β -триметилсилилэтансульфонамид (SES), 9-антраценсульфонамид, 4-(4',8'-диметоксинафтилметил)бензенсульфонамид (DNMBS), бензилсульфонамид, трифторметилсульфонамид и фенацисульфенамид.

Защитные группы карбоновых кислот включают силил-, алкил-, алкенил-, арил- и ариалкил-защищенные карбоновые кислоты.

Силильные защитные группы включают триметилсилил, триэтилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, триизопропилсилил и тому подобное.

Гидроксильные защитные группы включают метил, метоксиметил (MOM), метилтиометил (MTM), трет-бутилтиометил, (фенилдиметилсилил)метоксиметил (SMOM), бензилоксиметил (BOM), *p*-метоксибензилоксиметил (PMBM), (4-метоксифеноксид)метил (*p*-AOM), гваяколметил (GUM), трет-бутоксиметил, 4-пентенилоксиметил (POM), силкоксиметил, 2-метоксиэтоксиметил (MEM), 2,2,2-трихлорэтоксиметил, бис-(2-хлорэтоксид)метил, 2-(триметилсилил)этоксиметил (SEMOR), тетрагидропиранил (THP), 3-бромтетрагидропиранил, тетрагидротииопиранил, 1-метоксициклогексил, 4-метокситетрагидропиранил (MTHP), 4-метокситетрагидротииопиранил, 4-метокситетрагидротииопиранил S,S-диоксид, 1-[(2-хлор-4-метил)фенил]-4-метоксиперидин-4-ил (CTMP), 1,4-диоксан-2-ил, бензил, тетрагидрофуранил, тетрагидротииофуранил, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-октагидро-7,8,8-триметил-4,7-метанбензофуран-2-ил, 1-этоксид, 1-(2-хлорэтоксид)этил, 1-метил-1-метоксид, 1-метил-1-бензилоксид, 1-метил-1-бензилокси-2-фторэтил, 2,2,2-трихлорэтил, 2-триметилсилилэтил, 2-(фенилселенил)этил, трет-бутил, аллил, хлорфенил, *p*-метоксифенил, 2,4-динитрофенил, бензил, метоксидбензил, 3,4-диметоксидбензил, *o*-нитробензил, нитробензил, *p*-галобензил, 2,6-дихлорбензил, цианобензил, фенилбензил, 2-пиколил, 4-пиколил, 3-метил-2-пиколил N-оксид, дифенилметил, *p,p'*-динитробензгидрил, 5-добензосуверил, трифенилметил, α -нафтилдифенилметил, *p*-метоксифенилдифенилметил, ди(*p*-метоксифенил)фенилметил, три(*p*-метоксифенил)метил, 4-(4'-бромфенацилоксифенил)дифенилметил, 4,4',4"-трис-(4,5-дихлорфталимидофенил)метил, 4,4',4"-трис-(левулиноилоксифенил)метил, 4,4',4"-трис-(бензоилоксифенил)метил, 3-(имидазол-1-ил)бис-(4',4"-диметоксифенил)метил, 1,1-бис-(4-метоксифенил)-1'-пиренилметил, 9-антрин, 9-(9-фенил)ксантенил, 9-(9-фенил-10-оксо)антрин, 1,3-бензодитиолан-2-ил, бензизотиазолил S,S-диоксид, триметилсилил (TMS), триэтилсилил (TES), триизопропилсилил (TIPS), диметилизопропилсилил (DMIPS), диэтилизопропилсилил (DEIPS), диметилтексилсилил, трет-бутилдиметилсилил (TBS), трет-бутилдиметилсилил (TBDMS), трет-бутилдифенилсилил (TBDPS), трибензилсилил, три-ксилсилил, трифенилсилил, дифенилметилсилил (DPMS), трет-бутилметоксифенилсилил (TBMPS), формат, бензоилформат, пропионат, ацетат, хлорацетат, дихлорацетат, трихлорацетат, трифторацетат, метоксиацетат, трифенилметоксиацетат, феноксиацетат, хлорфеноксиацетат, 3-фенилпропионат, 4-оксопентаноат (левулинат), 4,4-(этилендитио)пентаноат (левулиноилдитиоацеталь), пивалоат, адамантоат, кротонат, 4-метоксикротонат, бензоат, *p*-фенилбензоат, 2,4,6-триметилбензоат (мезитоат), алкилметилкарбонат, 9-флуоренилметилкарбонат (Fmoc), алкилэтилкарбонат, алкил 2,2,2-трихлорэтилкарбонат (Troc), 2-(триметилсилил)этилкарбонат (TMSEC), 2-(фенилсульфонил)этилкарбонат (Psec), 2-(трифенилфосфонио)этилкарбонат (Peoc), алкилизобутилкарбонат, алкилвинилкарбонат, алкилаллилкарбонат, алкил-нитрофенилкарбонат, алкилбензилкарбонат, алкилметоксибензилкарбонат, алкил 3,4-диметоксибензилкарбонат, алкил-*o*-нитробензилкарбонат, алкилнитробензилкарбонат, алкил-S-бензилтиокарбонат, 4-этоксид-1-нафтилкарбонат, метилдитиокарбонат, 2-иодобензоат, 4-азидобутират, 4-нитро-4-метилпентаноат, *o*-(дибромометил)бензоат, 2-формилбензен сульфат, 2-(метилтиометокси)этил, 4-(метилтиометокси)бутират, 2-(метилтиометоксиметил)бензоат, 2,6-дихлор-4-метилфеноксиацетат, 2,6-дихлор-4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)феноксиацетат, 2,4-бис-(1,1-диметилпропил)феноксиацетат, хлордифенилацетат, изобутират, моносукциноат, (E)-2-метил-2-бутеноат, *o*-(метоксикарбонил)бензоат, α -нафтоат, нитрат, алкил-тетраметилфосфородиамидат, алкил-N-фенилкарбамат, борат, диметилфосфинотиоил, алкил 2,4-динитрофенилсульфенат, сульфат, метансульфонат (мезилат), бензилсульфонат и тозилат (Ts). 1,2-ор 1,3-диольные защитные группы включают метиленацеталь, этилиденацеталь, 1-трет-бутилэтилиденкеталь, 1-фенилэтилиденкеталь, (4-метоксифенил)этилиденацеталь, 2,2,2-трихлорэтилиденацеталь, ацетонид, циклопентилиденкеталь, циклогексидилиденкеталь, циклогептилиденкеталь, бензилиденацеталь, *p*-метоксибензилиденацеталь, 2,4-диметоксибензилиденкеталь, 3,4-диметоксибензилиденацеталь, 2-нитробензилиденацеталь, метоксиметиленацеталь, этоксиметиленацеталь, сложный ортоэфир диметоксиметилена, сложный ортоэфир 1-метоксиэтилидена, сложный ортоэфир 1-этоксидэтилидена, сложный ортоэфир 1,2-диметоксиэтилидена, сложный ортоэфир α -метоксибензилидена, производное 1-(N,N-диметиламино)этилидена, производное α -(M,N'-диметиламино)бензилидена, сложный ортоэфир 2-оксациклопентилидена, ди-трет-бутилсилиленовая группа (DTBS), производное 1,3-(1,1,3,3-тетраизопропилдиэтилоксанилидена) (TIPDS),

производное тетра-трет-бутоксидизилоксан-1,3-диилдена (TBDS), циклические карбонаты, циклические боронаты, этилборонат и фенилборонат.

Тиольные защитные группы включают сложные тиоэфиры, карбонаты, сульфонаты, аллиловые тиоэфиры, тиоэфиры, силиловые тиоэфиры, алкиловые тиоэфиры, арилалкиловые тиоэфиры и алкилосиалкиловые тиоэфиры.

Защитные группы сложных эфиров включают форматы, ацетаты, пропионаты, пентаноаты, кротонаты, бензоаты, формат, бензоилформат, хлорацетат, трифторацетат, метоксиацетат, трифенилметоксиацетат, р-хлорфеноксиацетат, 3-фенилпропионат, 4-оксопентаноат, 4,4-(этилендитио)пентаноат, пивалоат (триметилацетат), кротонат, 4-метокси-кротонат, бензоат, р-бенилбензоат, 2,4,6-триметилбензоат. Защитные группы сложных эфиров угольной кислоты включают 9-флуоренилметил, этил, 2,2,2-трихлорэтил, 2-(триметилсилил)этил, 2-(фенилсульфонил)этил, винил, аллил и р-нитробензилкарбонат. Защитные группы силиловых сложных эфиров включают триметилсилил, триэтилсилил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, триизопропилсилиловый эфир и другие триалкилсилиловые эфиры. Защитные группы алкиловых сложных эфиров включают метил, бензил, р-метоксибензил, 3,4-диметоксибензил, тритил, трет-бутил и аллиловый эфир и их производные. Защитные группы арилалкиловых сложных эфиров включают бензил, р-метоксибензил (PMB), 3,4-диметоксибензил, о-нитробензил, р-нитробензил, р-галобензил, 2,6-дихлорбензил, р-цианобензил, 2- и 4-пиколиловые эфиры.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу получения частицы, как описано в данном документе, включающему инкубирование незагруженной частицы (например, частицы, содержащей реакционноспособную группу) с линкером (например, линкером, содержащим функциональную группу), образуя посредством этого связь между частицей (например, реакционноспособной группой частицы) и линкером (например, функциональной группой); см. фиг. 8. В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубирование незагруженной частицы (например, частицы, содержащей множество реакционноспособных групп) с множеством линкеров (например, при этом каждый линкер содержит функциональную группу), образуя посредством этого связи между частицей (например, совокупностью реакционноспособных групп частицы) и совокупностью линкеров (например, функциональными группами совокупности линкеров). Способ может включать инкубирование линкера с агентом изобретения, образуя посредством этого связь между линкером и агентом. В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубирование множества линкеров с множеством агентов, образуя посредством этого связи между совокупностью линкеров и совокупностью агентов. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент может образовать связь с карбоксилем, первичным амином или тиолом. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления реакционноспособная группа и/или функциональная группа может образовать связь с карбоксилем, первичным амином или тиолом.

Реакционноспособная группа и/или функциональная группа может содержать биотинсвязывающий белок (например, авидин, мономерный авидин, стрептавидин, мономерный стрептавидин, нейтравидин, мономерный нейтравидин) или биотин. Например, реакционноспособная группа может содержать биотин, а функциональная группа может содержать биотинсвязывающий белок или реакционноспособная группа может содержать биотинсвязывающий белок, а функциональная группа может содержать биотин. Линкер может содержать биотинсвязывающий белок или биотин, например, при этом либо реакционноспособная группа частицы содержит биотин или биотинсвязывающий белок, соответственно, либо агент содержит биотин или биотинсвязывающий белок, соответственно. Агент может содержать биотинсвязывающий белок или биотин, например, при этом либо реакционноспособная группа частицы содержит биотин или биотинсвязывающий белок, соответственно, либо линкер содержит биотин или биотинсвязывающий белок, соответственно.

Линкер может содержать биотин и тиол, биотин и амин или биотин и карбоновую кислоту. Например, линкер может связывать агент, содержащий биотинсвязывающий белок, а функциональной группой линкера может быть тиол, амин или карбоновая кислота, т.е. для связывания агента с частицей. Аналогично, линкер может связывать частицу, содержащую биотинсвязывающий белок (например, при этом функциональной группой линкера является биотин), а тиол, амин или карбоновую кислоту линкера можно использовать для поперечного сшивания агента с частицей.

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа, и/или агент могут содержать α-галоацил, алкен, галоидный алкил, алкин, амин, арилизид, арилгалиды, азид, карбодимид, карбоксил, диен, диенофил, глиоксаль, имидоэфир, изоцианид, малеимид, N-гидроксисукцинимидильный (NHS) сложный эфир, фосфин, тетразин или тиол, например, для связывания агента с частицей. Например, частица может содержать функционализированную амином кремнеземную поверхность, при этом множество реакционноспособных групп представляют собой амины. Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент могут содержать антитело (или его антигенсвязывающий участок), пептид, белок, нуклеиновую кислоту или аптамер.

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент могут содержать азид или алкин, например, для иммобилизации агента посредством азид-алкинового циклоприсоединения Хуигена. Циклоприсоединение Хуигена представляет собой реакцию диполярофила с 1,3-диполярным

соединением, которая приводит к 5-членным (гетеро)циклам. Примерами диполярофилов являются алкены и алкины и молекулы, которые обладают родственными гетероатомными функциональными группами (например, карбонилами и нитрилами). 1,3-диполярные соединения содержат один или более гетероатомов и могут быть описаны, как имеющие по меньшей мере одну мезомерную структуру, которая представляет заряженный диполь. Они включают нитрилоксиды, азиды и диазоалканы. Катализируемая металлом клик-химия представляет собой чрезвычайно эффективный вариант 1,3-диполярной реакции циклоприсоединения Хуигена между алкил-арил)-сульфониламидами, C-N тройными связями и C-C тройными связями, который хорошо подходит к способам, раскрытым в данном документе. результатами этих реакций являются 1,2-оксазолы, 1,2,3-триазолы или тетразолы. Например, 1,2,3-триазолы образуются за счет катализируемой медью реакции Хуигена между алкинами и алкил/ариламидами. Катализируемые металлами реакции Хуигена проходят при окружающей температуре, не чувствительны к растворителям, т.е. неполярным, полярным, полуполярным, и являются высоко толерантными к функциональным группам. Неметаллические реакции Хуигена (также называемые способствующие деформации циклоприсоединение), включающие использование замещенного циклооктина, который обладает кольцевой деформацией, и электроноакцепторных заместителей, например, фтора, которые вместе способствуют [3+2] диполярному циклоприсоединению с азидами, особенно хорошо подходят для применения в данном документе вследствие низкой токсичности компонентов реакции по сравнению с катализируемыми металлами реакциями. Примеры включают DIFO и DIMAC. Реакция алкинов и азидов является очень специфической и по существу инертной в отношении химической среды биологических тканей.

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент может содержать тиол или алкен, например, для иммобилизации агента посредством тиол-еновой реакции алкена (гидротиилирование, т.е. присоединение RS-H через связь C=C). Тиол-еновая реакция проходит посредством свободнорадикального механизма роста цепи. Иницирование происходит за счет образования радикалов при УФ-возбуждении фотоинициатора или самого тиола. Тиол-еновые системы образуют комплексы переноса заряда в основном состоянии и, вследствие этого, фотополимеризуются даже в отсутствии инициаторов в разумные периоды полимеризации. Однако, добавление УФ излучения повышает скорость, с которой проходит реакция. Длину волны излучения можно модулировать по необходимости, в зависимости от размера и природы компонентов, соединенных с тиолом или алкеном.

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент могут содержать диен или диенофил, например, для иммобилизации агента посредством реакции Дильса-Альдера. Реакция Дильса-Альдера объединяет диен (молекулу с двумя чередующимися двойными связями) и диенофил (алкен) для получения колец и бициклических соединений.

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент могут содержать изоцианид или тетразин, например, для иммобилизации агента посредством циклоприсоединения 4+1.

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент могут содержать малеимид или тиол, например, для иммобилизации агента посредством малеимид-тиольной реакции (см., например, публикацию патентной заявки США № 2010/0036136, включенную настоящим посредством ссылки).

Реакционноспособная группа, линкер, функциональная группа и/или агент могут содержать фосфин или азид, например, для иммобилизации агента посредством реакции Штаудингера.

Классическая реакция Штаудингера представляет собой химическую реакцию, в которой комбинация азиды с фосфином или фосфитом дает промежуточный продукт аза-илид, который при гидролизе дает фосфиноксид и амин. Реакция Штаудингера представляет собой мягкий способ восстановления азиды в амин; а в качестве восстанавливающего агента обычно используют трифенилфосфин. При сшивании Штаудингера электрофильную ловушку (обычно сложный метиловый эфир) помещают надлежащим образом на триарилфосфин (обычно в орто на атом фосфора) и вводят в реакцию с азидом с получением промежуточного продукта аза-илид, который перегруппируется в водной среде с получением соединения с амидной группой и функцией фосфиноксида. Сшивание Штаудингера называется так потому, что оно лигирует вместе (соединяет/ковалентно связывает) две исходные молекулы, тогда как в классической реакции Штаудингера два продукта не связаны ковалентно после гидролиза.

Функциональные группы можно соединять с агентами за счет варьирования длины спейсерных ножек или мостиков, которыми могут быть алкильные цепи, PEG цепи, аминокислотные цепи или любые другие подходящие спейсеры. Например, линкер может содержать полиэтиленгликолевую (PEG) цепь, например, которая служит в качестве спейсера между функциональной группой и агентом, линкер может содержать, например, диэтиленгликоль, триэтиленгликоль, тетраэтиленгликоль, пентаэтиленгликоль или гексаэтиленгликоль. линкер может содержать, например, первую функциональную группу (например, R¹), полиэтиленгликолевый спейсер (например, -[OCH₂CH₂]_nO-, при этом n составляет целое число от 2 до 100, например от 2 до 50 или от 2 до 20), и вторую функциональную группу (например, R²). Например, линкером может быть молекула формулы R¹[OCH₂CH₂]_nOR² или R²[OCH₂CH₂]_nOR¹. Каждый R¹ и R² может быть независимо выбран из фрагмента, содержащего α-галоацил, алкен, галоидный алкил, алкин, амин, арилизид, арилгалиды, азид, карбодимид, карбоксил, диен, диенофил, глиоксаль, имидоэфир, изоцианид, малеимид, N-гидроксисукцинимидиловый (NHS) сложный эфир, фосфин, тетразин или тиол. R¹

может быть тиол, а R^2 может быть карбоксил, или R^2 может быть тиол, а R^1 может быть карбоксил. R^1 может быть тиол, а R^2 может быть амин, или R^2 может быть тиол, а R^1 может быть амин. R^1 может быть карбоксил, а R^2 может быть амин, или R^2 может быть карбоксил, а R^1 может быть амин.

Реакционноспособные группы и функциональные группы, подходящие для реакции с первичными аминами, включают имидоэфиры и N-гидроксисукцинимидиловые (NHS) сложные эфиры. Примеры имидоэфирных функциональных групп включают диметиладипимидат, диметилпимелимидат и диметилсуберимидат. Примеры NHS-сложноэфирных функциональных групп включают дисукцинимидилглутамат, дисукцинимидилсуберат и бис-(сульфосукцинимидил) суберат. Доступные аминогруппы, находящиеся на N-конце пептидов, полипептидов и белков, реагируют с NHS-сложными эфирами с образованием амидов, реакции перекрестного сшивания NHS-сложных эфиров можно проводить в фосфате, бикарбонате/карбонате, HEPES и боратных буферах. Можно использовать другие буферы, если они не содержат первичных аминов, реакцию NHS-сложных эфиров с первичными аминами можно проводить при pH между приблизительно 7 и приблизительно 9 и температуре между приблизительно 4 и 30°C в течение от приблизительно 30 мин до приблизительно 2 ч. Концентрация функциональной группы NHS-сложного эфира может варьировать от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 mM. NHS-сложные эфиры являются либо гидрофильными, либо гидрофобными. Гидрофильные NHS-сложные эфиры вводят в реакцию в водных растворах, хотя для достижения большей растворимости можно включить DMSO. Гидрофобные NHS-сложные эфиры растворяют в смешиваемом с водой органическом растворителе, а затем добавляют в водную реакционную смесь.

Сульфгидрильные реакционноспособные функциональные группы и реакционноспособные группы включают малеимиды, галоидные алкилы, арилгалиды и α -галоацилы, которые реагируют с сульфгидрилами с образованием тиолэфирных связей, и пиридилдисульфиды, которые реагируют с сульфгидрилами с получением смешанных дисульфидов.

Сульфгидрильные группы пептидов, полипептидов и белков можно создавать с помощью методов, известных специалистам в данной области, например, путем восстановления дисульфидных связей или присоединения за счет реакции с первичными аминами, используя 2-иминотиолан. Примеры малеимидных функциональных групп включают сукцинимидил 4-{N-малеимидометил}циклогексан-1-карбоксилат и m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир. Примеры галоацетальных функциональных групп включают N-сукцинимидил (4-иодоацеталь) аминобензоат и сульфосукцинимидил (4-иодоацеталь) аминобензоат. Примеры пиридилдисульфидных функциональных групп включают 1,4-ди-[3'-2'-пиридилдитио(пропионамидо)бутан] и N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат.

Реакционноспособные группы и/или функциональные группы могут содержать карбоксильные группы для связывания с первичными аминами или гидрозидами за счет использования карбодиимидов, что приводит к образованию амидных или гидрозоновых связей. Таким образом, на частице может быть иммобилизован карбокси-конец пептидов, полипептидов и белков. Примеры карбодиимидных функциональных групп и реакционноспособных групп включают 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид и N,N'-дициклогексилкарбодиимид. Арилизид становится реакционноспособным, когда подвергается ультрафиолетовому излучению с образованием арилнитрена. Примеры арилизидных функциональных групп включают азидабензоилгидразид и N-5-азидо-2 нитробензоилокисукцинимид. Глиоксальные функциональные группы выделяют гуанидиловый участок аргинина. Примером глиоксальной функциональной группы является p-азидофенилглиоксалмоногидрат.

Гетеробифункциональные линкеры, которые обладают двумя или более разными функциональными группами (например, первой функциональной группой, второй функциональной группой и необязательно дополнительными функциональными группами), подходят для применения в данном документе. Примеры включают линкеры, которые являются реакционноспособными с аминами на одном конце и реакционноспособными с сульфгидрилами на другом конце, например, 4-сукцинимидил-оксикарбонил-a-(2-пиридилдитио)-толуен, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат и малеимидные линкеры, обсуждавшиеся выше. Такие линкеры можно использовать для непрямого соединения реакционноспособной группы частицы с функциональной группой агента.

Агент может быть иммобилизован на частице за счет связывания с реакционноспособной группой. Например, пептид, полипептид или белок может быть иммобилизован путем образования связи между карбоксилем, первичным амином или тиолом пептида, полипептида или белка и реакционноспособной группой. В качестве альтернативы, агент можно модифицировать, например, с помощью линкера с образованием связи с реакционноспособной группой. В данной области известны различные способы модификации агента, например, белка, углевода или липида, (см., например, публикации патентных заявок США №№ 2014/0212425, 2014/0377837 и 2015/0005447 и патентов США №№ 4711955, 5047519, 7332355, 9040716, включенных настоящим посредством ссылки).

1,3-Диполярные соединения можно включать в белки, липиды, олигосахариды, олигонуклеотиды и гликаны, используя механизм обмена веществ, ковалентные ингибиторы и ферментный перенос. Например, азидогруппа, N_3 , может применяться на N-конце белков или пептидов, используя азидацетилхлорид (см., например, Haridas, et al., Tetrahedron Letters 48 (2007) 4719-4722). Азидогруппа представляет собой нуклеофильную группу, которая будет заменяться другими нуклеофильными группами, например,

ОН, NH₂ и галогенами (Br, Cl или I). NaN₃ представляет собой азидирующий агент, который способен азидировать белки за счет простого контакта с белками с 10 кратным молярным избытком NaN₃. Способ С-концевой азидизации описан у Cazalis, et al. *Bioconjugate Chem.* 15 (2004) 1005-1009. Инкубирование клеток с перацетилованным N-азидоацетилманнозамином снабжает гликаны клеточной поверхности азидосиаловой кислотой (см., например, Codelli et al. *J. Amer. Chem. Soc.* 130 (34) 11486-11493 (2008)). Меченые азидом липиды описаны у Smith, et al. *Bioconjugate Chem.* 19 (9), 1855-1863 (2008). Пегилирование является широко используемой методикой присоединения групп к пептидам и белкам и подходит для применения в данном документе. Например, PEG может быть ковалентно связан с аминокислотными остатками посредством реакционноспособного фрагмента. Реакционноспособными фрагментами (в отличие от реакционноспособных групп в данном документе) являются фрагменты, с которым может быть связана активированная PEG молекула (например, свободная амино или карбоксильная группа). Например, N-концевые аминокислотные остатки и лизиновые остатки имеют свободную аминогруппу, а С-концевые аминокислотные остатки имеют свободную карбоксильную группу. В качестве реакционноспособного фрагмента для прикрепления PEG также можно использовать сульфгидрильные группы (например, которые найдены на цистеиновых остатках). В дополнение, ферментные способы введения активированных групп (например, гидразида, альдегида и ароматических аминогрупп) специфически на С-конце полипептида. Соответственно, в данном документе можно использовать PEG, содержащий 1,3-диполярные соединения. Специалисты в данной области могут использовать любой известный способ соединения 1,3-диполярного соединения с белками, липидами, олигосахаридами, олигонуклеотидами и гликанами.

Частица может содержать реакционноспособную группу, содержащую азидогруппу или алкинилгруппу, а линкер или агент (например, функциональная группа линкера или агента) может содержать алкинилгруппу или азидогруппу, соответственно. Алкинилгруппа может образовывать ковалентную связь с азидогруппой, например, используя катализируемое медью алкин-азид циклоприсоединение. Известны способы получения частиц, содержащих азидогруппу или алкинилгруппу (см., например, Xu, Z. et al. *J Nanoparticle Research* 17:56 (2015)).

Функционализированные дипольрофилом белки, полипептиды и пептиды можно синтезировать путем связывания на N-конце, например, с помощью алкина (например, 3-бутинилхлорформата). В некоторых вариантах осуществления тиолы на цистеинах функционализируют алкином, несущим малеимид. Предоставление С-концевого дипольрофила может осуществляться, например, путем соединения с пропаргиламином, используя связывающий агент, например, N-гидроксисукцинимид/DCC. Концевые алкины можно установить, используя метаболические структурные блоки, например, алкиновые кислоты. Липиды могут быть функционализированы алкинами. Например, модифицированные алкином жирные кислоты можно создавать с помощью реакции концевого алкинил-алкилбромид с триметилфосфином с получением алкинил-диметилфосфонат с 16 атомами углерода (см., например, Raghavan et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 5982-5986). Как указано выше, пегилирование можно использовать для присоединения дипольрофильных групп к пептидам и белкам, и оно подходит для применения в данном документе. Также белкам, липидам, олигосахаридам, олигонуклеотидам и гликанам можно передать функциональность Дильса-Альдера и тиол-еновую функциональность.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления реакционноспособная группа содержит нуклеиновую кислоту, например, для гибридизации с агентом или функциональной группой (например, агентом или функциональной группой, которая содержит комплементарную нуклеиновую кислоту). Термин "нуклеиновая кислота" относится к ДНК или РНК. Нуклеиновая кислота может быть односпиральной или двухспиральной. Нуклеиновая кислота может содержать односпиральные области и/или двухспиральные области. Нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет порядок последовательных нуклеотидов в нуклеиновой кислоте, если считать от 5' к 3'. Нуклеиновая кислота может содержать множество нуклеотидных последовательностей. Например, двухспиральная нуклеиновая кислота содержит две нуклеотидные последовательности, каждая из которых охватывает длину нуклеиновой кислоты, при этом одна нуклеотидная последовательность может представлять собой обратный комплемент другой нуклеотидной последовательности. Нуклеиновая кислота также содержит нуклеотидные последовательности более короткие, чем длина нуклеиновой кислоты. Например, односпиральная нуклеиновая кислота, составляющая десять нуклеотидов в длину, имеет две нуклеотидные последовательности, составляющие девять нуклеотидов в длину. Аналогично, односпиральная нуклеиновая кислота, составляющая десять нуклеотидов в длину, имеет три нуклеотидные последовательности, составляющие восемь нуклеотидов в длину. Нуклеотидами нуклеиновой кислоты могут быть, например, цитозин (C), гуанин (G), аденин (A), тимин (T) и/или урацил (U). Нуклеотиды могут быть модифицированными или немодифицированными. Например, один или более нуклеотидов могут быть метилированными. Нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидный аналог и/или неестественную пару оснований. Нуклеотиды нуклеиновой кислоты могут включать 5-метилцитозин, псевдоуридин, дигидроуридин, инозин, ксантозин и/или 7-метилгуанозин.

Частица может содержать реакционноспособную группу, при этом реакционноспособная группа содержит нуклеиновую кислоту; и агент, при этом агент связан с комплементарной нуклеиновой кисло-

той, которая может создавать гибрид с нуклеиновой кислотой реакционноспособной группы, образуя посредством этого нековалентное соединение между агентом и частицей. Аналогично, частица может содержать реакционноспособную группу, при этом реакционноспособная группа содержит нуклеиновую кислоту; и функциональную группу, при этом функциональная группа содержит комплементарную нуклеиновую кислоту, которая может создавать гибрид с нуклеиновой кислотой реакционноспособной группы, образуя посредством этого нековалентное соединение между агентом и частицей. Нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, а комплементарная нуклеиновая кислота может содержать комплементарную нуклеотидную последовательность, например, при этом нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с обратным комплементом комплементарной нуклеотидной последовательности. Нуклеотидная последовательность может иметь 100% идентичность последовательности с обратным комплементом комплементарной нуклеотидной последовательности.

Предпочтительно температура плавления нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеиновой кислоты в физиологической текучей среде (например, крови) больше, чем температура тела (например, температура тела больного, например, человека или мыши). Например, температура плавления нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеиновой кислоты в физиологической текучей среде предпочтительно больше чем 37°C, например больше чем приблизительно 38°C, больше чем приблизительно 39°C, больше чем приблизительно 40°C, больше чем приблизительно 41°C, больше чем приблизительно 42°C, больше чем приблизительно 43°C, больше чем приблизительно 44°C или больше чем приблизительно 45°C. Температура плавления нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеиновой кислоты может составлять от приблизительно 37°C до приблизительно 120°C, например, от приблизительно 38°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 39°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 40°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 41°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 42°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 43°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 44°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 45°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 46°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 47°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 48°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 49°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 50°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 38°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 39°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 40°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 41°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 42°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 43°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 44°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 45°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 46°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 47°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 48°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 49°C до приблизительно 100°C или от приблизительно 50°C до приблизительно 100°C.

Длина нуклеиновой кислоты реакционноспособной группы, нуклеотидной последовательности реакционноспособной группы, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности предпочтительно больше чем 9 нуклеотидов. Длина нуклеиновой кислоты реакционноспособной группы, нуклеотидной последовательности реакционноспособной группы, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности может быть больше чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов. Длина нуклеиновой кислоты реакционноспособной группы, нуклеотидной последовательности реакционноспособной группы, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности может составлять от приблизительно 10 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, например, от приблизительно 11 нуклеотидов до приблизительно 80 нуклеотидов, от приблизительно 12 нуклеотидов до приблизительно 60 нуклеотидов, от приблизительно 13 нуклеотидов до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 14 нуклеотидов до приблизительно 40 нуклеотидов, от приблизительно 15 нуклеотидов до приблизительно 30 нуклеотидов или от приблизительно 16 нуклеотидов до приблизительно 25 нуклеотидов. GC содержание нуклеиновой кислоты, нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности может составлять от приблизительно 10% до приблизительно 100%, например, от приблизительно 40% до приблизительно 100%, от приблизительно 45% до приблизительно 100%, от приблизительно 50% до приблизительно 100%, от приблизительно 55% до приблизительно 100%, от приблизительно 40% до приблизительно 95%, от приблизительно 45% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 85% или от приблизительно 55% до приблизительно 80%.

XII. Расположение агента на частице.

В некоторых вариантах осуществления геометрия частицы такова, что иммобилизованный агент имеет пониженную или существенно пониженную способность взаимодействовать с биомолекулой на поверхности клетки, например, иммунной клетки, клетки крови или лимфоцита. Иммобилизованный агент может иметь меньше чем 50% (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) способности связывания с биомолекулой на поверхности клетки относительно свободной, растворимой формы агента. Например, в некоторых вариантах осуществления TNF α или IL-2, иммобилизованный на поверхности частицы, описанной в данном документе, имеет меньше чем 50% (например, 45, 40, 35,

30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) способности свободного TNF α или IL-2 для связывания с рецептором TNF α или рецептором IL-2 на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления растворимая биомолекула, связанная с частицей, имеет пониженную или существенно пониженную способность взаимодействовать со своим когнатным лигандом (вторым элементом пары специфического связывания). Биомолекула может быть связана с частицей посредством агента. Биомолекула, связанная с частицей, может иметь меньше чем 50% (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) способности взаимодействовать со своим когнатным лигандом относительно способности несвязанной биомолекулы. Например, растворимый TNFR, связанный с частицей, описанной в данном документе, имеет меньше чем 50% (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) способности свободного, растворимого TNFR взаимодействовать со свободным TNF α . В еще одном примере растворимый вирион, связанный с частицей, описанной в данном документе, имеет меньше чем 50% (например, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) способности свободного вириона взаимодействовать со своим когнатным рецептором (рецепторами) клеточной поверхности и инфицировать клетку.

В некоторых вариантах осуществления агент может быть иммобилизован на внутренней поверхности частицы (например, в порах пористой частицы или на внутренней поверхности трубки). В некоторых вариантах осуществления агент может быть иммобилизован на внешней поверхности частицы, но стерически огражден от взаимодействия с клеточной поверхностью с помощью одного или более выступов из частицы. В некоторых вариантах осуществления, например, тороидальных частиц, агент иммобилизован на внутренней поверхности частицы так, что агент имеет пониженную или существенно пониженную способность взаимодействовать с биомолекулой на поверхности клетки, и/или растворимая биомолекула, связанная с частицей посредством агента, имеет пониженную или существенно пониженную способность взаимодействовать со своим когнатным лигандом (вторым элементом пары специфического связывания).

Иллюстративная геометрия частицы, способная уменьшать или существенно уменьшать взаимодействие агента с биомолекулой на клеточной поверхности, или взаимодействие между биомолекулой, связанной с частицей, и ее когнатным лигандом, показана на фиг. 1-6 и описана в данном документе.

XIII. Агенты и покрытия для обеспечения клиренса.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит агент клиренса. Агент клиренса может облегчать клиренс частицы посредством биологического пути, например, путем экскреции с мочой, разложения, экскреции гепатобилиарным путем и/или фагоцитоза.

Например, частица может содержать резервуар, при этом резервуар содержит агент клиренса. Резервуар может представлять собой отверстие или пустоту в корпусе частицы, например, пустоту в корпусе частицы из пористого кремния.

Для частиц, содержащих поры, резервуаром может быть пора, или резервуар может быть больше или меньше, чем пора среднего размера. Резервуар может состоять из углубления в корпусе частицы (например, мелкого углубления), при этом ширина или диаметр углубления больше, чем ширина или диаметр поры среднего размера. Ширина или диаметр резервуара может быть по меньшей мере приблизительно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300, 400 или даже приблизительно в 500 раз больше, чем ширина или диаметр поры среднего размера. Ширина или диаметр резервуара может быть от приблизительно в 2 раза до приблизительно в 10 раз больше ширины или диаметра поры среднего размера, например, от приблизительно в 2 раза до приблизительно в 8 раз или от приблизительно в 2 раза до приблизительно в 6 раз. Ширина или диаметр резервуара может быть приблизительно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 250, 300, 400 или даже приблизительно в 500 раз больше ширины или диаметра поры среднего размера.

Для частиц, содержащих каркас ДНК, резервуаром может быть внутренняя область каркаса ДНК. Резервуар (например, внутренняя область) может быть недоступной для клеток, например, каркас ДНК может быть сконструирован так, что каркас стерически мешает попаданию клеток во внутреннюю область. В некоторых вариантах осуществления резервуар (например, внутренняя область) недоступен для внеклеточных белков, например, каркас ДНК может быть сконструирован так, что каркас стерически мешает попаданию в резервуар внеклеточных белков. Резервуар (например, внутренняя область) может быть недоступен для антител. Тем не менее, каркас ДНК может обеспечивать, чтобы резервуар (например, внутренняя область) становился доступным для клеток и/или внеклеточных белков через заданный промежуток времени. Например, каркас ДНК может содержать биоразлагаемую стенку, которая может разлагаться через заданный промежуток времени (например, путем гидролиза), открывая посредством этого агент клиренса для клеток и/или внеклеточных белков. Каркас ДНК может содержать биоразлагаемый затвор, который может разлагаться через заданный промежуток времени (например, путем гидролиза), обеспечивая осуществление конформационного изменения каркаса ДНК, открывая посредством этого агент клиренса для клеток и/или внеклеточных белков (см., например, публикацию патентной заявки

РСТ № WO 2014/170899, включенную настоящим посредством ссылки). Аналогично, каркас ДНК может содержать резервуар, который содержит отверстие, как описано ниже.

Резервуар может содержать отверстие. Отверстие может быть закрыто крышкой или мембраной, ингибируя посредством этого взаимодействия между агентом клиренса и клетками и/или внеклеточными белками (например, антителами). Крышка или элемент может содержать полимер, например, биоразлагаемый полимер. Крышка или элемент может разлагаться через заданный промежуток времени (например, путем гидролиза), открывая посредством этого агент клиренса для клеток и/или внеклеточных белков. Крышка или элемент может разлагаться (например, биоразлагаться), подвергаясь воздействию биологической текучей среды (например, плазмы крови или внеклеточной жидкости) в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 5 лет, например, от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 лет, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 лет или от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 года.

Заданным периодом времени может быть период времени, когда частица находится в жидкости (например, в водосодержащей жидкости). Заданным периодом времени может быть период нахождения частиц *in vivo* (например, воздействие биологических текучих сред, pH, ферментов и/или температуры). Заданный период времени может определяться, по меньшей мере частично, связыванием частицы с биомолекулой. Например, частица может быть выполнена так, что связывание биомолекулы открывает агент клиренса для клеток и/или внеклеточных белков (см., например, публикацию патентной заявки РСТ № WO 2014/170899, включенную настоящим посредством ссылки). Заданный период времени может составлять от приблизительно 1 дня до приблизительно 5 лет, например, от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 лет или от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 года.

Иллюстративные материалы, подходящие для применения в качестве крышек или мембран, описаны в патенте США № 7918842, который включен настоящим посредством ссылки. Обычно эти материалы разлагаются или растворяются либо путем ферментативного гидролиза, либо за счет воздействия воды *in vivo* или *in vitro*, либо за счет поверхностной или объемной эрозии. Показательные синтетические, биоразлагаемые полимеры включают: поли(амиды), например, поли(аминокислоты) и поли(пептиды); поли(сложные эфиры) например, поли(молочную кислоту), поли(гликолевую кислоту), поли(молочную-ко-гликолевую кислоту), и поли(капролактон); поли(ангидриды); поли(ортоэфиры); поли(карбонаты); и их химические производные (замены, присоединения химических групп, например, алкила, алкилена, гидроксирования, окисления и другие модификации, повседневно производимые специалистами в данной области), сополимеры и их смеси. Другие полимеры, которые можно использовать в крышках или мембранах, включают: поли(эфиры), например, поли(этиленоксид), поли(этиленгликоль) и поли(тетраметилоксид); виниловые полимеры-поли(акрилаты) и поли(метакрилаты), например, метил, этил, другой алкил, гидроксиэтилметакрилат, акриловую и метакриловую кислоты, и другие, например, поли(виниловый спирт), поли(виниловый пиролитон), и поли(виниловый ацетат); поли(уретаны); целлюлозу и ее производные, например, алкил, гидроксиалкил, эфиры, сложные эфиры, нитроцеллюлозу, и различные ацетаты целлюлозы; поли(силоксаны); и любые их химические производные (замены, присоединения химических групп, например, алкила, алкилена, гидроксирования, окисления и другие модификации, повседневно производимые специалистами в данной области), сополимеры и их смеси. В некоторых вариантах осуществления крышка резервуара образована из одного или более перекрестно сшитых полимеров, например, перекрестно сшитого поливинилового спирта.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит покрытие. В некоторых вариантах осуществления покрытие содержит агент клиренса. Покрытие может маскировать агент клиренса.

Частица может содержать первую поверхность и вторую поверхность; агент может быть иммобилизован на первой поверхности; а покрытие может закрывать по меньшей мере часть второй поверхности. Первой поверхностью может быть внутренняя поверхность или находящаяся внутри поверхность, например, первая поверхность может быть ориентирована так, что агент имеет пониженную способность связывания с молекулой на клеточной поверхности. Примеры внутренней поверхности или находящейся внутри поверхности включают внутренние стенки поры, резервуара или трубки, внутреннюю периферическую поверхность тороида или полость вогнутой поверхности. Другие примеры внутренней поверхности или находящейся внутри поверхности включают внешнюю поверхность частицы, при этом внешняя поверхность защищена от взаимодействия с клетками одним или более выступами. Второй поверхностью может быть наружная поверхность или внешняя поверхность, например, вторая поверхность может быть ориентирована так, что покрытие может взаимодействовать с клеткой. В некоторых вариантах осуществления частица может содержать одну или более коровых субчастиц и множество защищающих субчастиц. Частица может содержать защитный элемент, а защитный элемент может содержать множество защищающих субчастиц. Первой поверхностью может быть поверхность одной или более коровых частиц, а второй поверхностью может быть поверхность защищающих субчастиц.

Покрытие может ингибировать взаимодействия между частицами, например, покрытие может уменьшать предрасположенность частиц к образованию агрегатов. Покрытие может ингибировать взаимодействия между частицей и клетками, например, путем обеспечения биологически инертной поверхности. Покрытие может ингибировать неспецифические взаимодействия с внеклеточными молекулами, например, неспецифическую адсорбцию биомолекул. Покрытие может ингибировать специфические

взаимодействия с клетками или внеклеточными молекулами, например, покрытие может затруднять или замедлять выделение или фагоцитоз частицы. Покрытие может намечать частицу для выделения или фагоцитоза. Покрытие или другая особенность (например, "индуцирующее выделение соединения"), которая намечает частицу для выделения или фагоцитоза, может быть замаскирована покрытием (например, вторым покрытием), что откладывает выделение или фагоцитоз частицы, например, способствуя сохранению частиц в кровотоке в течение заданного промежутка времени.

Покрытие может содержать множество удлиненных покрывающих молекул, связанных на одном конце с поверхностью частицы. Покрытие может ингибировать взаимодействия между биомолекулой, связанной с частицей, и вторым элементом пары специфического связывания, которая включает биомолекулу. Покрытие может ингибировать взаимодействия между биомолекулой, связанной с частицей, и клеткой. Агент может быть ориентирован на частице относительно покрытия так, что агент имеет пониженную способность связывания с молекулой на поверхности клетки. Агент может быть ориентирован на частице относительно покрытия так, что агент имеет пониженную способность связывания с мишенью на поверхности клетки. Агент может быть ориентирован на частице относительно покрытия так, что покрытие стерически ингибирует связывание агента с молекулой на поверхности клетки. Агент может быть ориентирован на частице таким образом, что покрытие стерически ингибирует связывание агента с мишенью на поверхности клетки. Покрытие может быть ориентировано на частице таким образом, что агент частицы имеет пониженную способность связывания с молекулой на поверхности клетки. Покрытие может уменьшать способность агента частицы активировать рецепторный белок клеточной поверхности относительно способности естественного лиганда рецепторного белка клеточной поверхности.

Частица может содержать второе покрытие, например, при этом второе покрытие состоит из второго множества покрывающих молекул. Частица может содержать второе множество покрывающих молекул. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул может уменьшать клиренс частицы *in vivo*, например, за счет маскировки покрытия и/или множества покрывающих молекул. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул могут быть биоразлагаемыми, например, открывая покрытие и/или множество покрывающих молекул для клеток и/или внеклеточных белков через заданный промежуток времени. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул могут содержать биоразлагаемый полимер, например, каждая молекула из второго множества покрывающих молекул может содержать биоразлагаемый полимер. Второе покрытие и/или второе множество покрывающих молекул может содержать CD47, который ингибирует фагоцитоз.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит первую поверхность (например, внутреннюю поверхность) и вторую поверхность (например, наружную поверхность или внешнюю поверхность); агент иммобилизован на первой поверхности; а покрытие закрывает по меньшей мере часть второй поверхности. Ориентация первой поверхности может уменьшать способность агента взаимодействовать с молекулами на клеточной поверхности. Ориентация второй поверхности может обеспечивать взаимодействие между покрытием и клетками, внеклеточными молекулами и/или иными частицами, "взаимодействие" между покрытием и клетками, внеклеточными молекулами и/или иными частицами может быть слабым, нейтральным или неблагоприятным взаимодействием, например, затрудняя стабильное связывание частицы с клеткой, внеклеточной молекулой или иными частицами. В качестве альтернативы, взаимодействие между покрытием и либо клетками и/или внеклеточными молекулами может представлять собой специфическое или спланированное взаимодействие, например, с поддержкой клиренса частицы по биологическому пути, например, фагоцитоза. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вторая поверхность по существу не содержит агент. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления первая поверхность по существу не содержит покрытие. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления покрытие закрывает по существу всю вторую поверхность.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит первую поверхность (например, внутреннюю поверхность) и вторую поверхность (например, наружную поверхность или внешнюю поверхность); агент иммобилизован на первой поверхности и второй поверхности; а покрытие закрывает по меньшей мере часть второй поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие (и/или второе покрытие) может ингибировать взаимодействия между агентом и молекулами на клеточной поверхности. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления покрытие закрывает по существу всю вторую поверхность.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит первую поверхность (например, внутреннюю поверхность) и вторую поверхность (например, наружную поверхность или внешнюю поверхность); агент иммобилизован на первой поверхности; а покрытие закрывает по меньшей мере часть первой поверхности и по меньшей мере часть второй поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие предпочтительно не затрагивает способность агента специфически связывать биомолекулу. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления покрытие закрывает по существу всю вторую поверхность.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит поверхность; агент иммобилизован на поверхности; а покрытие закрывает по меньшей мере часть поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие может не влиять на способность агента специфически связывать биомолекулу. Покрытие

может позволять некоторым агентам специфически связывать биомолекулу и ингибировать взаимодействия между некоторыми агентами и биомолекулой. Покрытие может ингибировать взаимодействия между агентом и молекулами на клеточной поверхности. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления покрытие закрывает по существу всю поверхность.

В некоторых вариантах осуществления частица содержит покрытие, которое закрывает по меньшей мере часть второй поверхности, и второе покрытие, которое закрывает по меньшей мере часть, например, по существу все покрытие на второй поверхности. В таких вариантах осуществления покрытие может содержать агент клиренса, например, "индуцирующее выделение соединения", намечая частицу для выделения или фагоцитоза. Такое покрытие может содержать бета-циклодекстрин. Второе покрытие может содержать материал, например, второе множество покрывающих молекул, чтобы ингибировать взаимодействие с клетками и/или ингибировать неспецифические взаимодействия с внеклеточными молекулами, например, неспецифическую адсорбцию биомолекул. Второе покрытие может быть биоразлагаемым, например, открывая покрытие на второй поверхности для клеток и/или внеклеточных белков через заданный промежуток времени. Например, в частице, содержащей одну или более коровых субчастиц и множество защищающих субчастиц, когда агент захвата иммобилизован на поверхности на коровой субчастице (субчастицах) (т.е. на первой поверхности), по меньшей мере часть поверхности защищающих субчастиц (т.е. второй поверхности) содержит покрытие, например, либо покрытие, содержащее агент клиренса, либо покрытие, содержащее материал, чтобы ингибировать взаимодействие с клетками и/или чтобы ингибировать неспецифическое взаимодействие с внеклеточными молекулами.

Покрытие может содержать покрывающие молекулы, например, покрытие может состоять из множества покрывающих молекул, или покрытие может состоять из совокупности покрывающих молекул. Как использовано в данном документе, каждый термин "множество покрывающих молекул" и "совокупность покрывающих молекул" относится к покрытию. Однако термин "покрытие" может относиться к дополнительным композициям, таким как гидрогель. Покрывающая молекула может представлять собой агент клиренса (и таким образом, агентом клиренса может быть покрывающая молекула).

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

Частица может содержать поверхность и вторую поверхность, при этом со второй поверхностью может быть связано множество агентов, иммобилизованных на поверхности, и по меньшей мере одна молекула из множества покрывающих молекул. Например, все или по существу все молекулы из множества покрывающих молекул могут быть связаны со второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления некоторые молекулы из множества покрывающих молекул связаны с поверхностью, а некоторые молекулы из множества покрывающих молекул связаны со второй поверхностью.

В некоторых вариантах осуществления покрывающие молекулы увеличивают клиренс частицы *in vivo*. Например, покрывающие молекулы могут содержать ассоциированную патогеном молекулярную структуру.

В некоторых вариантах осуществления частицы, описанные в данном документе, имеют покрытие, содержащее индуцирующее выделение соединения, которое облегчает выведение частиц из кровотока, например, почками, печенью/кишечником (например, через желчь), или с помощью фагоцитоза (например, антигенпрезентирующими клетками). Множеством покрывающих молекул может быть множество индуцирующих выделение соединений. Например, в вариантах осуществления, в которых частицы являются тороидальными, внутренняя периферическая поверхность (например, первая поверхность) может содержать иммобилизованный агент, а внешняя поверхность (например, вторая поверхность) может содержать соединение, которое индуцирует клиренс частиц, например, почками, печенью или с помощью макрофагов. В некоторых вариантах осуществления индуцирующее выделение соединения запрограммировано. То есть соединение может быть закрыто покрытием, которое с течением времени (например, за заданный промежуток времени) разлагается (например, за счет действия ферментов, гидролиза или постепенного растворения), открывая в итоге индуцирующее выделение соединения или другую особенность, которая увеличивает скорость клиренса. Покрытие может разлагаться, подвергаясь воздействию биологической текучей среды (например, плазмы крови или внеклеточной жидкости) в течение от приблизительно 1 дня до приблизительно 5 лет, например от приблизительно 1 дня до приблизительно 3 лет или от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 года. Таким образом, присутствие частицы *in vivo* можно модифицировать и/или регулировать.

Покрытие может содержать органический полимер, например, полиэтиленгликоль (PEG). Органический полимер может быть соединен с частицей, например, соединен с поверхностью частицы. Органический полимер может содержать PEG, полилактат, полимолочные кислоты, сахара, липиды, полиглутаминовую кислоту, полигликолевую кислоту (PGA), полимолочную кислоту (PLA), поли(молочную-когликолевую кислоту) (PLGA), поливинилацетат (PVA) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления частица ковалентно конъюгирована с PEG, который препятствует адсорбции белков сыворотки, облегчает эффективное выведение мочи и уменьшает агрегацию частицы (см., например, Burns et al.

Nano Letters, 9(1):442-448 (2009) и публикации патентных заявок США №№ 2013/0039848 и 2014/0248210, каждая из которых включена настоящим посредством ссылки).

В одном варианте осуществления покрытие содержит по меньшей мере один гидрофильный фрагмент, например, полимеры типа Pluronic® (неионный полиоксиэтилен-полиоксипропилен блок-сополимер с общей формулой $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$), триблок-сополимер поли(этиленгликоль-b-(DL-молочная кислота-ко-гликолевая кислота)-b-этиленгликоль) (PEG-PLGA-PEG), диблок-сополимер поликапролактон-PEG (PCL-PEG), поли(винилиден фторид)-PEG (PVDF-PEG), поли(молочная кислота-ко-PEG) (PLA-PEG), поли(метил метакрилат)-PEG (PMMA-PEG) и так далее. В варианте осуществления с таким фрагментом гидрофильным фрагментом является фрагмент PEG, например: [метокси(полиэтиленокси)пропил]триметоксисилан (например, $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6-9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)_3$), [метокси(полиэтиленокси)пропил]диметоксисилан (например, $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6-9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2$) или [метокси(полиэтиленокси)пропил]монометоксисилан (например, $\text{CH}_3(\text{OC}_2\text{H}_4)_{6-9}(\text{CH}_2)\text{OSi}(\text{OCH}_3)$). Подходящие покрытия описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2011/0028662 (включенной настоящим посредством ссылки).

Покрытие может содержать полигидроксильированный полимер, например, естественные полимеры или гидроксилсодержащие полимеры, включая многократно гидроксильированные полимеры, полисахариды, углеводы, полиолы, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, например, полисерин или другие полимеры, например, 2-(гидроксиэтил)метакрилат, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полигидроксильированными полимерами являются полисахариды. Полисахариды включают маннан, поллулан, мальтодекстрин, крахмалы, целлюлозу и производные целлюлозы, камеди, ксантановую камедь, камедь бобов рожкового дерева или пектин, их комбинации (см., например, публикацию патентной заявки США № 2013/0337070, включенную настоящим посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления покрытие содержит цвиттерионный полимер (см., например, публикации патентных заявок США №№ 2014/0235803, 2014/0147387, 2013/0196450, и 2012/0141797; и патент США № 8574549, каждый из которых включен настоящим посредством ссылки).

Другие подходящие покрытия включают поли-альфа-гидроксикислоты (включая полимолочную кислоту или полилактид, полигликолевую кислоту, или полигликолид), поли-бета-гидроксикислоты (например, полигидроксibuтират или полигидроксивалерат), эпоксиполимеры (включая полиэтиленоксид (PEO)), поливиниловые спирты, сложные полиэфиры, сложные полиортоэфиры, полиамидоэфиры, полиэфирамиды, полифосфоэфиры и полифосфоэфируретаны. Примеры разлагаемых сложных полиэфиров включают: поли(гидроксиалканоаты), включая поли(молочную кислоту) или (полилактид, PLA), поли(гликолевую кислоту) или полигликолид (PGA), поли(3-гидроксibuтират), поли(4-гидроксibuтират), поли(3-гидроксивалерат) и поли(капролактон) или поли(валеролактон). Примеры полиоксаэфиров включают поли(алкиленоксалаты) например, поли(этиленоксалат)) и полиоксаэфиры, содержащие амидогруппы. Другие подходящие материалы покрытия включают полиэфиры, включая полигликоли, сополимеры простых и сложных эфиров (сополи(эфир-сложные эфиры)) и поликарбонаты. Примеры биоразлагаемых поликарбонатов включают полиортокарбонаты, полииминокарбонаты, полиалкилкарбонаты, например, поли(триметиленкарбонат), поли(1,3-диоксан-2-он), поли(р-диоксанопе), поли(6,6-диметил-1,4-диоксан-2-он), поли(1,4-диоксепан-2-он) и поли(1,5-диоксепан-2-он). Подходящие биоразлагаемые покрытия также могут содержать полиангидриды, полиимины (например, поли(этиленимин) (PEI)), полиамиды (включая поли-N-(2-гидроксипропил)-метакриламид), поли(аминокислоты) (включая полилизин, например, поли-L-лизин, или полиглутаминовую кислоту, например, поли-L-глутаминовую кислоту), полифосфазены (например, поли(феноксико-карбоксилатофеноксифосфазен), полиорганфосфазены, полицианоакрилаты и полиалкилцианоакрилаты (включая полибутилцианоакрилат), полиизоцианаты и поливинилпирролидоны.

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

Частица может быть покрыта существующим в природе полимером, включая фибрин, фибриноген, эластин, казеин, коллагены, хитозан, внеклеточный матрикс (ECM), каррагенан, хондроитин, пектин, альгинат, альгиновую кислоту, альбумин, декстрин, декстраны, желатины, маннитол, п-галамин, полисахариды, поли-1,4-глюканы, крахмал, гидроксиэтилкрахмал (HES), диальдегид крахмала, гликоген, амилазу, гидроксиэтиламилазу, амилопектин, глюкозогликаны, жирные кислоты (и их сложные эфиры), гиалуроновую кислоту, протамин, полиаспарагиновую кислоту, полиглутаминовую кислоту, D-маннуоновую кислоту, L-гулуоновую кислоту, зеин и другие проламины, альгиновую кислоту, гуаровую камедь и фосфорилхолин, а также сополимеры и их производные. Покрытие также может содержать модифицированный полисахарид, например, целлюлозу, хитин, декстран, крахмал, гидроксиэтилкрахмал, полиглюконат, гиалуроновую кислоту и элатин, а также их сополимеры и производные.

Частица может быть покрыта гидрогелем. Гидрогель может быть образован, например, с использованием базового полимера, выбранного из любых подходящих полимеров, например, поли(гидроксиалкил(мет)акрилатов), сложных полиэфиров, поли(мет)акриламидов, поли(винилпирролидона) или поливинилового спирта. Перекрестносшитым агентом может быть одно или более из пероксидов, серы, дихлорида серы, оксидов металлов, селена, теллура, диаминов, диизоциана-

тов, алкилфенилдисульфидов, тетраалкилтиурамдисульфидов, 4,4'-дитиоморфолина, р- хининдиоксида и тетрахлор-р-бензохинона. Также, в гидрогели могут быть включены содержащие бориную кислоту полимеры, с необязательными фотополимеризируемыми группами.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления покрытие содержит материал, который одобрен для применения Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA). Эти одобренные FDA материалы включают полигликолевую кислоту (PGA), полимолочную кислоту (PLA), полилактид 910 (содержащий соотношение 9:1 гликолида на лактидное звено и известный также как VICRYL™), полигликонат (содержащий соотношение 9:1 гликолида на триметилленкарбонатное звено и известный также как MAXON™) и полидиоксанон (PDS).

Присоединение покрытия к частице может осуществляться за счет ковалентной связи или нековалентной связи, например, за счет ионной связи, водородной связи, гидрофобной связи, координации, сшивания или физической абсорбции или взаимодействия.

Обычные способы покрытия наночастиц включают сухие и влажные подходы. Сухие способы включают: (a) физическое осаждение паровой фазы (Zhang, Y. et al., *Solid State Commun.* 115:51 (2000)), (b) плазменную обработку (Shi, D. et al., *Appl. Phys. Lett.* 78:1243 (2001); Vollath, D. et al., *J. Nanoparticle Res.* 1:235 (1999)), (c) химическое осаждение паровой фазы (Takeo, O. et al. *J. Mater. Chem.* 8:1323 (1998)) и (d) пиролиз полимерных или неполимерных органических материалов для осаждения *in situ* наночастиц внутри матрикса (Sglavo, V. M. et al. *J. Mater. Sci.* 28:6437 (1993)). Влажные способы покрытия частиц включают: (a) золь-гель методы и (b) методы эмульгации и испарения растворителя (Cohen, H. et al. *Gene Ther.* 7:1896 (2000); Hrkach, J. S. et al. *Biomaterials* 18:27 (1997); Wang, D. et al. *J. Control. Rel.* 57:9 (1999)). Покрытие может быть нанесено путем гальванопокрытия, напыления покрытия, покрытия окутанием, распыления, химического осаждения в паровой фазе или физического осаждения в паровой фазе. Кроме того, в данной области известны способы покрытия различных наночастиц полисахаридами (см., например, патент США № 8685538 и публикацию патентной заявки США № 2013/0323182, каждая из которых включена настоящим посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления частицы могут быть приспособлены для облегчения клиренса путем экскреции почками. Почечный клиренс для больных с нормальной почечной функцией обычно требует частиц по меньшей мере с одним измерением, меньшим, чем 15 нм (см., например, Choi, H.S. et al. *Nat Biotechnol* 25(1):1165 (2007); Longmire, M. et al. *Nanomedicine* 3(5):703 (2008)). Тем не менее, большие частицы могут экскретироваться с мочой. Для вариантов осуществления, в которых частица является слишком большой для почечного клиренса, частица, тем не менее, может быть выведена после разложения *in vivo* до меньшего размера.

В некоторых вариантах осуществления частицы могут быть приспособлены для улучшения клиренса посредством гепатобилиарной экскреции. Система мононуклеарных фагоцитов (MPS), которая включает клетки Купфера в печени, участвует в захвате печенью и последующей билиарной экскреции наночастиц. Известно, что определенный размер и свойства поверхности наночастиц увеличивают захват MPS в печени (см. Choi et al., *J. Dispersion Sci. Tech.* 24(3/4):475-487 (2003) and Brannon-Peppas et al., *J. Drug Delivery Sci. Tech.* 14(4):257-264 (2004), каждая из которых включена посредством ссылки). Например, известно, что повышение гидрофобности частицы повышает захват MPS. Таким образом, специалист в данной области может выбрать частицы, имеющие определенные характеристики, для модулирования билиарной экскреции. Гепатобилиарная система обеспечивает экскрецию частиц, которые немного больше, чем частицы, которые могут экскретироваться через почечную систему (например, от 10 до 20 нм). Для вариантов осуществления, в которых частица является слишком большой для гепатобилиарной экскреции, частица, тем не менее, может быть выделена после разложения *in vivo* до меньшего размера. В таких вариантах осуществления покрытие, которое облегчает клиренс посредством гепатобилиарной экскреции, может покрывать участок внутренней поверхности частицы так, что покрытие становится открытым после разложения частицы. Частица может содержать множество покрывающих молекул, например, гидрофобных молекул, которые покрывают участок поверхности. Поверхность может открываться после разложения частицы, обеспечивая клиренс разлагаемой частицы.

В некоторых вариантах осуществления частица приспособлена к улучшению клиренса посредством фагоцитоза. Например, частица может содержать агент клиренса, при этом агент клиренса включает патоген-ассоциированный молекулярный паттерн, например, для распознавания макрофагами. Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) включают метилированную CpG ДНК (бактериальную), двухспиральную pDNA (вирусную), липополисахарид (бактериальный), пептидогликан (бактериальный), липоарабиноманнан (бактериальный), зимозан (дрожжей), липопроотеиды микоплазм, такие как MALP-2 (бактериальный), флагеллин (бактериальный), поли(инозиновая-цитидиловая) кислота (бактериальная), липотейхоевая кислота (бактериальная) и имидазохинолины (синтетические). В предпочтительных вариантах осуществления агент клиренса PAMP замаскирован так, что макрофаги не поглощают частицу перед связыванием частицы с одной или более мишенями. Например, агент клиренса PAMP может быть замаскирован любым одним из вышеупомянутых покрытий (например, полимерное покрытие, например, биоразлагаемое полимерное покрытие). Макрофаги могут поглощать частицы размером до

20 мкм (см., например, Cannon, G.J. and Swanson, J.A., J. Cell Science 101:907-913 (1992); Champion, J.A., et al., Pharm Res 25(8):1815-1821 (2008)). В некоторых вариантах осуществления агент клиренса, который облегчает клиренс посредством фагоцитоза, может покрывать участок внутренней поверхности частицы так, что агент клиренса становится открытым после разложения частицы. Частица может содержать множество агентов клиренса, например, РАРР, который покрывает участок поверхности. Поверхность может быть открытой после разложения частицы, обеспечивая клиренс разлагаемой частицы. Агент клиренса может покрывать участок поверхности, который перекрывает поверхность, содержащую агент. Агент клиренса (например, РАРР) может вызывать иммунный ответ против частицы, например, после разложения второго покрытия или после разложения частицы.

В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, направленный против агента клиренса (например, РАРР) может превосходить иммунный ответ, направленный против агента и/или агента/комплекса биомолекул, ингибируя посредством этого или откладывая начало иммунного ответа, направленного против агента и/или агента/ комплекса биомолекул. Например, разложение частицы может открывать для воздействия как агент клиренса, так и агент (и/или агент/ комплекс биомолекул) для лейкоцитов. Агент клиренса РАРР может обеспечивать быстрый клиренс разлагаемой частицы макрофагами, посредством этого замедляя иммунный ответ (например, опосредованный В-клетками иммунный ответ) против агента и/или агента/комплекса биомолекул.

Агентом клиренса может быть кальретикулин, который индуцирует фагоцитоз.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления покрывающая молекула содержит нуклеиновую кислоту, например, для гибридизации покрывающей молекулы с частицей, содержащей каркас ДНК. Например, частица может содержать нуклеиновую кислоту и покрывающую молекулу, при этом покрывающая молекула содержит комплементарную нуклеиновую кислоту, что может создавать гибрид с нуклеиновой кислотой, образуя посредством этого связь между покрывающей молекулой и частицей (т.е. водородную связь). Нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, и комплементарная нуклеиновая кислота может содержать комплементарную нуклеотидную последовательность, например, при этом нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с обратным комплементом комплементарной нуклеотидной последовательности. Нуклеотидная последовательность может иметь 100% идентичность последовательности с обратным комплементом комплементарной нуклеотидной последовательности.

Предпочтительно температура плавления нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеиновой кислоты в физиологической текучей среде (например, крови) больше, чем температура тела (например, температура тела больного, например, человека или мыши). Например, температура плавления нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеиновой кислоты в физиологической текучей среде предпочтительно больше чем 37°C, например больше чем приблизительно 38°C, больше чем приблизительно 39°C, больше чем приблизительно 40°C, больше чем приблизительно 41°C, больше чем приблизительно 42°C, больше чем приблизительно 43°C, больше чем приблизительно 44°C или больше чем приблизительно 45°C. Температура плавления нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеиновой кислоты может составлять от приблизительно 37°C до приблизительно 120°C, например, от приблизительно 38°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 39°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 40°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 41°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 42°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 43°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 44°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 45°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 46°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 47°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 48°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 49°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 50°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 38°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 39°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 40°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 41°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 42°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 43°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 44°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 45°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 46°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 47°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 48°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 49°C до приблизительно 100°C или от приблизительно 50°C до приблизительно 100°C.

Длина нуклеиновой кислоты реакционноспособной группы, нуклеотидной последовательности реакционноспособной группы, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности предпочтительно больше чем 9 нуклеотидов. Длина нуклеиновой кислоты реакционноспособной группы, нуклеотидной последовательности реакционноспособной группы, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности может быть больше чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов. Длина нуклеиновой кислоты реакционноспособной группы, нуклеотидной последовательности реакционноспособной группы, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности может составлять от приблизительно 10 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, например от приблизительно 11 нуклеотидов до приблизительно 80 нуклеотидов, от приблизительно 12 нуклеотидов до приблизительно 60 нуклеотидов, от приблизительно 13 нуклеотидов до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно

14 нуклеотидов до приблизительно 40 нуклеотидов, от приблизительно 15 нуклеотидов до приблизительно 30 нуклеотидов или от приблизительно 16 нуклеотидов до приблизительно 25 нуклеотидов. GC содержание нуклеиновой кислоты, нуклеотидной последовательности, комплементарной нуклеиновой кислоты и комплементарной нуклеотидной последовательности может составлять от приблизительно 10% до приблизительно 100%, например, от приблизительно 40% до приблизительно 100%, от приблизительно 45% до приблизительно 100%, от приблизительно 50% до приблизительно 100%, от приблизительно 55% до приблизительно 100%, от приблизительно 40% до приблизительно 95%, от приблизительно 45% до приблизительно 90%, от приблизительно 50% до приблизительно 85% или от приблизительно 55% до приблизительно 80%.

В некоторых вариантах осуществления частица может выводиться организмом за от приблизительно 1 день до приблизительно 5 лет, например, от приблизительно 1 день до приблизительно 3 года или от приблизительно 1 день до приблизительно 1 год.

XIV. Варианты применения.

Композиции (например, частицы и их фармацевтические композиции) описанные в данном документе, используются во многих диагностических и терапевтических вариантах применения. Например, частицы, описанные в данном документе, можно использовать для лечения рака, детоксикации больного или лечения вирусных или бактериальных инфекций.

Терапевтические варианты применения включают введение одной или более композиций, описанных в данном документе, больному, например, больному человеку, используя множество способов, которые частично зависят от пути введения. Путем может быть, например, внутривенная инъекция или инфузия (IV), подкожная инъекция (SC), интраперитонеальная (IP) инъекция или внутримышечная инъекция (IM).

В некоторых аспектах изобретение относится к способу удаления биомолекулы из композиции, включающему контакт композиции с частицей, как описано в данном документе. Такие способы особенно полезны для научного исследования. Например, относительно легко добавлять биомолекулу в раствор, однако немного более сложно удалять конкретную биомолекулу из раствора.

Современные методики удаления биомолекулы из раствора включают, например, связывание биомолекулы с частицей, такой как сефарозный шарик, а затем физическое отделение шарика от раствора. Частицы, описанные в данном документе, могут изолировать биомолекулу в композиции, ингибируя посредством этого взаимодействия с другими компонентами композиции (например, клетками), без необходимости физического отделения частиц от композиции.

Частица может содержать флуорофор. Частица может быть магнитной или парамагнитной, или частица может содержать магнитную или парамагнитную субчастицу или компонент, который обеспечивает притягивание частицы в магнитное поле.

Способ может включать контакт композиции с частицей, как описано в данном документе, при этом композицией является клеточная культура. Например, клеточной культурой может быть бактериальная клеточная культура или тканевая культура. Такие способы могут быть полезны, например, для выведения секреторного белка из клеточной культуры или для выведения из клеточной культуры загрязнителя.

Способ может включать контакт композиции с частицей, как описано в данном документе, при этом композицией является клеточный лизат. Клеточным лизатом может быть прокариотический или эукариотический клеточный лизат. Такие способы могут быть полезны, например, для ингибирования активности биомолекулы-мишени.

Приведенные выше способы могут быть особенно полезны для оценки функции биомолекулы, представляющей интерес в конкретной системе. Например, биомолекулу можно вводить в систему (например, тканевую культуру) для оценки влияния биомолекулы на систему (например, на клеточную пролиферацию или клеточную смерть), и биомолекулу можно выводить из аналогичной системы, используя частицу, как описано в данном документе, для оценки влияния на систему отсутствия биомолекулы.

XV. Наборы для соединения агента с частицей.

В некоторых аспектах изобретение относится к набору для получения утилизирующей частицы. Набор может содержать множество частиц. Набор может содержать инструкции для соединения реакционноспособных групп частицы с множеством агентов для получения утилизирующей частицы. Набор может содержать инструкции для функционализации реакционноспособных групп частицы для получения утилизирующей частицы. Набор может дополнительно включать множество линкеров. Каждый линкер из множества линкеров может содержать первую функциональную группу, способную избирательно реагировать с агентом, несущим заданный фрагмент, способный реагировать с первой функциональной группой. Каждый линкер из множества линкеров может содержать вторую функциональную группу, способную избирательно реагировать с реакционноспособными группами частиц. В некоторых вариантах осуществления набор не содержит линкеров, например, при этом реакционноспособные группы частицы могут избирательно реагировать с агентом, соединяя посредством этого агент с частицей. Набор может дополнительно содержать множество агентов, при этом каждый агент несет заданный фрагмент. Заданным фрагментом может быть первичный амин, гуанидин, тиол или карбоксильная груп-

па, например, для агента, который содержит пептид или белок. В некоторых вариантах осуществления набор не содержит агент, например, для создания специальной утилизирующей частицы.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит второе множество линкеров, например, при этом каждый линкер из второго множества линкеров содержит третью функциональную группу, способную избирательно реагировать с агентом, несущим второй заданный фрагмент, способный реагировать с третьей функциональной группой. Например, первая функциональная группа может быть способна реагировать с заданным фрагментом белка, а третья функциональная группа может быть способна реагировать с заданным фрагментом нуклеиновой кислоты так, чтобы частица могла быть нагружена белком и/или нуклеиновой кислотой за счет использования разных линкеров.

XVI. Способы получения утилизирующей частицы.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу получения утилизирующей частицы. Способ может включать реакцию частицы с множеством агентов. Каждый агент из множества агентов может содержать функциональную группу или заданный фрагмент, способный избирательно реагировать с реакционноспособной группой из множества реакционноспособных групп. Каждая реакционноспособная группа может быть ориентирована на частице таким образом, что после соединения агента с частицей, агент имеет пониженную способность связывания с молекулой на поверхности клетки (например, эукариотической клетки, например, диплоидной клетки, например, диплоидной клетки человека, например, иммунной клетки или раковой клетки).

Способ может дополнительно включать реакцию множества агентов с множеством линкеров, например, перед реакцией частицы с множеством агентов. Например, каждый линкер из множества линкеров может содержать первую функциональную группу, способную избирательно реагировать с агентом, несущим заданный фрагмент, способный реагировать с первой функциональной группой. Каждый линкер из множества линкеров может содержать вторую функциональную группу, способную избирательно реагировать с реакционноспособными группами частиц. Таким образом, агент может быть функционализирован добавлением функциональной группы, которая может избирательно реагировать с реакционноспособной группой частицы. Каждый линкер может содержать защищающую группу, например, которая защищает вторую функциональную группу. Способ может дополнительно включать снятие защиты с линкера, например, после реакции множества агентов с множеством линкеров.

Способ может дополнительно включать реакцию частицы с множеством линкеров, например, перед реакцией частицы с множеством агентов. Например, каждый линкер из множества линкеров может содержать вторую функциональную группу, способную избирательно реагировать с реакционноспособной группой. Каждый линкер из множества линкеров может содержать первую функциональную группу, способную избирательно реагировать с агентом, несущим заданный фрагмент, способный реагировать с первой функциональной группой. Таким образом, частица может быть функционализирована для избирательного реагирования с заданным фрагментом агента. Каждый линкер может содержать защищающую группу, например, которая защищает первую функциональную группу. Способ может дополнительно включать снятие защиты с линкера, например, после реакции частицы с множеством линкеров.

Способы получения утилизирующей частицы могут приводить к частицам, содержащим агент, который не может связывать биомолекулу, например, если связывающая область агента соединяется с реакционноспособной группой и/или линкером. Тем не менее, совокупность агентов может быть доступна для специфического связывания биомолекулы. В некоторых вариантах осуществления каждый агент из множества агентов может специфически связывать биомолекулу. В некоторых вариантах осуществления каждый агент частицы может специфически связывать биомолекулу.

Способы получения утилизирующей частицы могут приводить к частицам, содержащим агент, который может взаимодействовать с клетками, например, раковыми клетками или иммунными клетками. Тем не менее, совокупность агентов может демонстрировать пониженную способность связывания с молекулой на поверхности клетки (например, диплоидной клетка человека, раковой клетки и/или иммунной клетки). В некоторых вариантах осуществления каждый агент из множества агентов демонстрирует пониженную способность связывания с молекулой на поверхности клетки (например, диплоидной клетка человека, раковой клетки и/или иммунной клетки), например, относительно агента, иммобилизованного на наружной поверхности частицы. В некоторых вариантах осуществления каждый агент частицы демонстрирует пониженную способность связывания с молекулой на поверхности клетки (например, диплоидной клетка человека, раковой клетки и/или иммунной клетки), например, относительно агента, иммобилизованного на наружной поверхности частицы.

Изложенное выше применимо к любым композициям и способам, описанным в данном документе. В раскрытии конкретно предусматривается любая комбинация признаков таких композиций и способов (отдельно или в сочетании) с признаками, описанными для различных наборов, описанных в этом разделе.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно рядому специалисту в области, к которой относится это раскрытие. В данном документе описаны предпочтительные способы и материалы, хотя на практике или при тестировании раскрытых теперь способов и композиций также можно использовать способы и мате-

риалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в данном документе. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей полноте.

Раскрытие предусматривает все комбинации любых из вышеупомянутых аспектов и вариантов осуществления, а также комбинации с любыми из вариантов осуществления, изложенных в подробном описании и примерах. Эти и другие аспекты настоящего раскрытия станут более понятны при рассмотрении следующих примеров, которые предназначены для пояснения некоторых отдельных вариантов осуществления раскрытия, но не предназначены для ограничения его объема правовых притязаний, который ограничен формулой изобретения.

Примеры

Пример 1. Способ получения кремниевых частиц.

Получают пористые кремниевые диски с размерами 1000 нм на 400 нм и 1000 нм на 800 нм с различными размерами пор. Характеристику размера и морфологии дисков, а также диаметров пор получают с помощью сканирующей электронной микроскопии. Золотые наночастицы (Au) помещают в поры пористых кремниевых дисков. Факторы некроза опухоли (TNFs) конъюгируют с поверхностями золотых наночастиц посредством обменных ковалентных связей. Оценивают плотность лиганда и стабильность связывания TNF-Au.

Пример 2. Способ получения полимерных частиц.

Поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) частицы получают с помощью эмульсии. Характеристику размера и морфологии PLGA частиц получают с помощью сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии. Частицы покрывают бета-циклодекстрином четвертичного аммония, для активации макрофагов (т.е. фагоцитоза). Покрытие проверяют путем атомно-силовой микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии. Характеристику плотности и равномерности покрытия получают с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и динамического рассеяния света.

PLGA частицы с бета-циклодекстриновым покрытием инкубируют с макрофагами, а фагоцитоз отслеживают с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

PLGA частицы с бета-циклодекстриновым покрытием покрывают смесью полиэтиленгликоля (PEG) и тиольных фрагментов, обеспечивая предотвращение опсонизации и уклонения от поглощения макрофагами, а также связывания с другими частицами. Характеристику равномерности и плотность PEG и тиольного покрытий получают путем атомно-силовой микроскопии.

Характеристику стабильности покрытия получают путем инкубирования частиц в среде в течение различных периодов времени. Уклонение и поглощение частиц отслеживают в разные моменты времени путем инкубирования частиц с макрофагами, как описано выше.

PLGA частицы покрывают фактором некроза опухоли (TNF), и частицы объединяют с помощью дисульфидных связей с образованием "губки", содержащей TNF на внутренней поверхности губки. Наружную поверхность (т.е. внешнюю поверхность) губки необязательно блокируют с частицами, которые не содержат TNF для предотвращения взаимодействия между TNF губки и клетками.

Несмотря на то что настоящее раскрытие было описано со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалистам в данной области должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения, а эквиваленты могут быть замещены без выхода за пределы истинной сущности и объема правовых притязаний раскрытия. В дополнение, можно произвести множество модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, способа, стадии или стадий способа к цели, сущности и объему правовых притязаний настоящего раскрытия. Предполагается, что все такие модификации находятся в пределах объема правовых притязаний раскрытия.

Пример 3. Способ получения частиц ДНК.

Нанотрубка ДНК будет составлена с использованием протоколов, аналогичных протоколам, описанным у Douglas et al. (Nature 459(7245):414-8 (2009), включенном настоящим посредством ссылки во всей своей полноте). Нанотрубки будут содержать пять внутренних биотинов. Нити ДНК, которые не включены в нанотрубки, будут удаляться с использованием фильтровальной единицы с MWCO 300 кДа. Характеристики нанотрубок будут получены с помощью атомно-силовой микроскопии.

Меченный биотином TNF α будет смешан со стрептавидиновым тетрамером в соотношении 3:1 для получения TNF α модулей с тремя TNF α человека, связанными с одной молекулой стрептавидина, в концентрации приблизительно 300 нм. Затем TNF α модули будут инкубировать с ДНК нанотрубками для получения нанотрубок, содержащих TNF α модули. Нанотрубки будут очищать с использованием фильтровальной единицы с MWCO 300 кДа, и характеристика будет получена с помощью атомно-силовой микроскопии.

Для подтверждения соединения TNF α модулей с нанотрубками и для получения растворов нанотрубок, содержащих TNF α с концентрацией 5, 10, 15, 25, 35 и 50 нм (каталог Abcam #ab181421) будет использован TNF α анализ.

Способность TNF α нанотрубок связывать растворимый TNF-рецептор необходимо оценивать, используя ELISA анализ (каталог Abcam #ab100642). Кратко, нанотрубки в разных концентрациях необхо-

димо добавлять в разные лунки 96-луночного планшета, покрытого антителом против растворимого рецептора TNF. В лунки необходимо добавить растворимый рецептор TNF, планшет необходимо инкубировать в течение некоторого периода времени, а затем нанотрубки необходимо вымыть из лунок наряду с растворимым TNF, который связан с нанотрубками. В лунки необходимо добавить биотинилированное антитело против растворимого рецептора TNF, лунки следует промыть для выведения несвязанного антитела, в лунки необходимо добавить конъюгированный с пероксидазой хрена стрептавидин, лунки следует промыть для выведения несвязанной пероксидазы хрена, и в лунки необходимо добавить 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Количество TNF-рецептора, связанного с антителами против TNF-рецептора лунок, необходимо количественно определить путем мониторинга ТМБ при 450 нм и/или получения 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимина из ТМБ при 650 нм. Лунки, которые получают более высокие концентрации нанотрубок будут демонстрировать более высокое поглощение при 450 нм и более низкое поглощение при 650, соответствующее менее растворимому TNF-рецептору, связанному с лунками, и, таким образом, меньшей активности пероксидазы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Частица для соединения агента для получения утилизирующей частицы, способной утилизировать растворимые биомолекулы-мишени, при этом

растворимая биомолекула-мишень представляет собой белок, нуклеиновую кислоту или углевод;

частица включает металл, окись алюминия, стекло, кремнезем, кремний или полимер;

частица содержит множество реакционноспособных групп, где каждая реакционноспособная группа из множества реакционноспособных групп адаптирована для избирательного реагирования с агентом, содержащим предварительно определенную функциональную группу;

агент включает антитело, связывающий биомолекулу фрагмент антитела, каркасный белок, не принадлежащий антителу, нуклеиновую кислоту, аптамер, белок интерлейкина, лиганд семейства факторов некроза опухоли (TNF), хемокин, цитокин, фермент или растворимый рецепторный белок;

размер частицы составляет меньше чем 300 нм; и

(i) частица содержит покрытие, и по меньшей мере одна реакционноспособная группа множества реакционноспособных групп ориентирована на частице относительно покрытия таким образом, что, после того как агент свяжется с этой реакционноспособной группой через предварительно определенную функциональную группу, покрытие стерически ингибирует связывание агента с молекулой на поверхности клетки;

(ii) частица включает коровую субчастицу и множество защищающих субчастиц, и по меньшей мере одна реакционноспособная группа множества реакционноспособных групп иммобилизована на коровой субчастице, где по меньшей мере одна реакционноспособная группа множества реакционноспособных групп ориентирована на частице относительно защищающих субчастиц таким образом, что, после того как агент свяжется с этой реакционноспособной группой через предварительно определенную функциональную группу, защищающие субчастицы стерически ингибируют связывание агента с молекулой на поверхности клетки; или

(iii) частица включает один или более обращенных наружу выступов по меньшей мере из одной из ее вершин, и один или более выступов имеет размер и ориентирован таким образом, что, (i) после того как агент связывается по меньшей мере с одной реакционноспособной группы множества реакционноспособных групп через предварительно определенную функциональную группу, связывание агента с рецепторным белком клеточной поверхности или активация агента ингибируется и/или (ii) после того как агент связывается по меньшей мере с одной реакционноспособной группой множества реакционноспособных групп через предварительно определенную функциональную группу и после того как мишень свяжется с агентом, ингибируется взаимодействие мишени и второго элемента пары специфического связывания, в которой мишень является первым элементом.

2. Частица по п.1, где каждая реакционноспособная группа множества реакционноспособных групп включает алкенил, галоидный алкил, алкинил, амин, арилазид, арилгалид, азид, карбодиимид, карбоксил, диен, диенофил, глиоксаль, галоацил, имидоэфир, изоцианид, малеимид, N-гидроксисукцинимидиловый сложный эфир, фосфин, тетразин, тиол, нуклеиновую кислоту, формирующую комплексы включения группу, группу, включающую биотин, или группу биотинсвязывающего белка.

3. Частица по п.1 или 2, при этом множество реакционноспособных групп состоит из от 10 до 10^9 реакционноспособных групп, от 10^3 до 10^7 реакционноспособных групп или от 10^4 до 10^6 реакционноспособных групп.

4. Частица для соединения агента для получения утилизирующей частицы, способной утилизировать растворимые биомолекулы-мишени, содержащая первое множество реакционноспособных групп и второе множество реакционноспособных групп, при этом

растворимая биомолекула-мишень представляет собой белок, нуклеиновую кислоту или углевод;

частица включает металл, окись алюминия, стекло, кремнезем, кремний или полимер;

где каждое из первого множества реакционноспособных групп и второго множества реакционно-

способных групп независимо состоит из двух или более реакционноспособных групп;

каждая реакционноспособная группа из первого множества реакционноспособных групп адаптирована для избирательного реагирования с первым агентом, содержащим первую предварительно определенную функциональную группу;

каждая реакционноспособная группа из второго множества реакционноспособных групп адаптирована для избирательного реагирования со вторым агентом, содержащим вторую предварительно определенную функциональную группу;

каждый первый агент и второй агент независимо включает антитело, связывающий биомолекулу фрагмент антитела, каркасный белок, не принадлежащий антителу, нуклеиновую кислоту, аптамер, белок интерлейкина, лиганд семейства факторов некроза опухоли (TNF), хемокин, цитокин, фермент или растворимый рецепторный белок;

размер частицы составляет меньше чем 300 нм; и

(i) частица содержит покрытие, и по меньшей мере одна реакционноспособная группа первого множества реакционноспособных групп и/или второго множества реакционноспособных групп ориентирована на частице относительно покрытия таким образом, что, после того как агент свяжется с этой реакционноспособной группой через первую предварительно определенную функциональную группу и/или вторую предварительно определенную функциональную группу, покрытие стерически ингибирует связывание агента с молекулой на поверхности клетки;

(ii) частица включает коровую субчастицу и множество защищающих субчастиц, и по меньшей мере одна реакционноспособная группа первого множества реакционноспособных групп и/или второго множества реакционноспособных групп иммобилизована на коровой субчастице, где по меньшей мере одна реакционноспособная группа первого множества реакционноспособных групп и/или второго множества реакционноспособных групп ориентирована на частице относительно защищающих субчастиц таким образом, что, после того как агент свяжется с этой реакционноспособной группой через первую предварительно определенную функциональную группу и/или вторую предварительно определенную функциональную группу, защищающие субчастицы стерически ингибируют связывание агента с молекулой на поверхности клетки; или

(iii) частица включает по меньшей мере один обращенный наружу выступ по меньшей мере из одной из ее вершин, и один или более выступов имеет размер и ориентирован таким образом, что, (i) после того как агент связывается по меньшей мере с одной реакционноспособной группы множества реакционноспособных групп через предварительно определенную функциональную группу, связывание агента с рецепторным белком клеточной поверхности или активация агента ингибируется, и/или (ii) после того как агент связывается по меньшей мере с одной реакционноспособной группой множества реакционноспособных групп через предварительно определенную функциональную группу, и после того как мишень свяжется с агентом, ингибируется взаимодействие мишени и второго элемента пары специфического связывания, в которой мишень является первым элементом.

5. Частица по п.4, где каждая реакционноспособная группа первого множества реакционноспособных групп и каждая реакционноспособная группа второго множества реакционноспособных групп независимо включают алкенил, галоидный алкил, алкинил, амин, арилазид, арилгалид, азид, карбодиимид, карбоксил, диен, диенофил, глиоксаль, галоацил, имидоэфир, изоцианид, малеимид, N-гидроксисукцинимидиловый сложный эфир, фосфин, тетразин, тиол, нуклеиновую кислоту, группу, включающую биотин, или группу биотинсвязывающего белка.

6. Частица по п.4 или 5, при этом первая предварительно определенная функциональная группа отличается от второй предварительно определенной функциональной группы.

7. Частица по п.4 или 5, при этом

первая предварительно определенная функциональная группа такая же, как вторая предварительно определенная функциональная группа; и

по меньшей мере одна реакционноспособная группа первого множества реакционноспособных групп или второго множества реакционноспособных групп защищена защищающей группой.

8. Частица по любому из предшествующих пунктов, при этом частица имеет форму и размер для циркуляции в сосудистой сети субъекта.

9. Частица по любому из предшествующих пунктов, где покрытие содержит множество покрывающих молекул или фрагментов покрытия и покрывающие молекулы или фрагменты покрытия содержат покрывающий полимер.

10. Частица по п.9, при этом покрывающий полимер содержит полиэтиленгликоль (PEG), полилактат, полимолочную кислоту, сахар, липид, полиглутаминовую кислоту, полигликолевую кислоту (PGA), полимолочную кислоту (PLA), поли(молочную-ко-гликолевую кислоту) (PLGA), поливинилацетат (PVA) и их комбинации.

11. Частица по п.9, при этом множество покрывающих молекул или фрагментов покрытия являются биоразлагаемыми.

12. Частица по любому из предшествующих пунктов, при этом частица является пористой;

частица содержит внешние поверхности и внутренние поверхности; внутренние поверхности состоят из внутренних стенок пор частицы, и реакционноспособные группы расположены на внутренних поверхностях частицы.

13. Частица по любому из предшествующих пунктов, при этом частица содержит коровую субчастицу и множество защищающих субчастиц и реакционноспособные группы расположены на коровой субчастице.

14. Частица по любому из предшествующих пунктов, при этом молекула на поверхности клетки является мембраноассоциированной формой растворимой биомолекулы-мишени.

15. Частица по любому из предшествующих пунктов, при этом молекула на поверхности клетки представляет собой рецепторный белок клеточной поверхности.

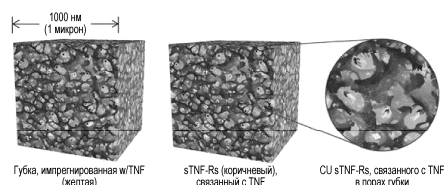
16. Частица по п.1, где каждая реакционноспособная группа множества реакционноспособных групп выполнена таким образом, что агент, связанный с реакционноспособной группой, имеет более низкую аффинность связывания для мембраноассоциированной формы растворимой биомолекулы-мишени, чем аффинность связывания агента, который свободно находится в растворе для той же мембраноассоциированной формы растворимой биомолекулы-мишени.

17. Частица по любому из предшествующих пунктов, где агент включает $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, лиганд Fas, лимфотоксин, лимфотоксин альфа, лимфотоксин бета, лиганд 4-1BB, лиганд CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TRAIL, лиганд CD40, лиганд CD27, лиганд OX40, фактор активации В-клеток (BAFF; TNFSF13B; BLYS), эктодисплазин А (EDA), индуцируемый при активации лиганд рецептора семейства TNFR (AITRL), ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL), активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL).

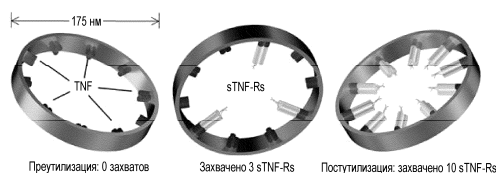
18. Частица по любому из предшествующих пунктов, где частица включает золото, платину, латекс, полиакриламид или полиметакрилат.

19. Частица по любому из предшествующих пунктов, где растворимая биомолекула-мишень представляет собой вирусный белок, бактериальный белок, компонент бактериальной клеточной стенки, дрожжевой или грибной белок, компонент дрожжевой или грибной клеточной стенки, белок простейших, токсин, яд, яд животного происхождения, аллерген, канцероген, лекарственное средство, агент химического оружия, гормон, цитокин, нейромедиатор, растворимый внеклеточный рецептор, антитело и растворимый белок матрикса.

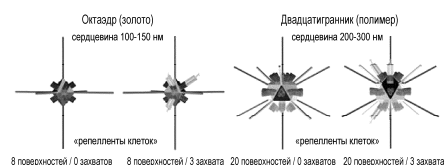
20. Частица по любому из пп.1-18, где растворимую биомолекулу-мишень выбирают из $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, растворимого TNFR-1, растворимого TNFR-2, лимфотоксина, лимфотоксина альфа, лимфотоксина бета, лиганда 4-1BB, лиганда CD30, EDA-A1, LIGHT, TL1A, TWEAK, TRAIL и растворимого TRAIL рецептора.



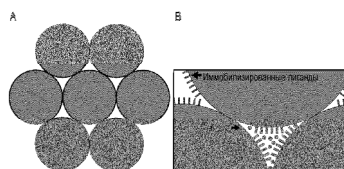
Фиг. 1



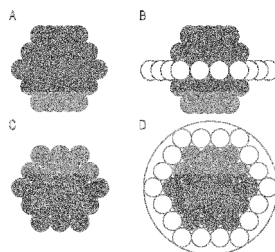
Фиг. 2



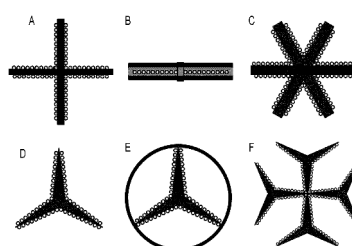
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

