

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041682**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.11.22**

(51) Int. Cl. *A61K 33/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201990307**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.08.09**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В СПОСОБАХ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТЕРАПИИ**

---

(31) **1613772.1; 1701827.6**

(32) **2016.08.10; 2017.02.03**

(33) **GB**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/EP2017/070183**

(87) **WO 2018/029247 2018.02.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНАЙТЕД КИНГДОМ РИСЕРЧ  
ЭНД ИННОВЕЙШН (GB)**

(72) Изобретатель:  
**Пауэлл Джонатан Джозеф, Фариа  
Нуно Хорхе Родригес, Хьюитт Рейчел  
Элейн (GB), Вис Брэдли Майкл (CA),  
Бастос Карлос (GB)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) MIRIAM BENEZRA ET AL.: "Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 121, no. 7, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 2768-2780, XP055295072, US, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI45600, page 2769

MIRIAM BENÉZRA ET AL.: "Ultrasml Integrin-Targeted Silica Nanoparticles Modulate Signaling Events and Cellular Processes in a Concentration-Dependent Manner", SMALL, vol. 11, no. 14, 3 April 2015 (2015-04-03), pages 1721-1732, XP055283143, DE, ISSN: 1613-6810, DOI: 10.1002/smll.201402331, page 1722  
WO-A2-2009088250

---

(57) Описаны композиции, содержащие частицы диоксида кремния, имеющие средний размер, определенный стандартными способами определения размера, от 0,5 до 20 нм, для применения при активации лимфоцитов в культуре или цельной крови.

---

**B1**

**041682**

**041682  
B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим наночастицы диоксида кремния, и их применению в способах активации Т-лимфоцитов при терапии, и, в частности, к биомаркерам, которые характеризуют эффективность композиций на основе частиц диоксида кремния при их применении в терапии. Также описаны исследования и способы скрининга, основанные на применении указанных маркеров, и устройства и наборы для получения и/или доставки композиций на основе наночастиц диоксида кремния или Т-лимфоцитов, активированных *ex vivo* перед введением субъекту.

### Уровень техники

Кремний распространен повсеместно в окружающей среде, и в настоящее время взрослое население стран Западного мира употребляет примерно от 15 до 50 мг кремния ежедневно. В природе он существует в виде силикатов, в которых кремний связан с атомами кислорода. Для описания указанных структур также используют такие термины, как кремниевая кислота и диоксид кремния. Они могут включать как простейшую монокремниевую кислоту, также называемую ортокислотой, так и частицы диоксида кремния. В настоящем документе термины "силикат" и "диоксид кремния" могут использоваться взаимозаменяемо и обозначают материалы, содержащие кремний, кислород и водород, которые также могут содержать другие ионы, но, главным образом, состоят из кремния и кислорода, причем содержание водорода определяется такими факторами, как размер, степень конденсации, рН и т.д. Точная биологическая роль растворенных силикатов в настоящее время до конца не выяснена, но все больше фактов подтверждают их существенное влияние на состояние соединительных тканей (Jugdaohsingh et al., 2008). Основные соединительные ткани включают кости, суставы, кровеносные сосуды, кожу, волосы и ногти, но при этом также имеются весомерные доказательства благоприятного действия растворимых или полимерных силикатов, применяемых в составе продуктов питания, пищевых добавок или терапевтических средств, при разнообразных медицинских состояниях, включая остеопороз, остеопению и другие нарушения опорно-двигательного аппарата и суставов, все типы рака, различные кожные состояния, сосудистые, сердечно-сосудистые и коронарные заболевания сердца, воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, болезнь Альцгеймера и различные формы когнитивных расстройств, различные типы инфекций, раны и язвы, нарушения желудочно-кишечного тракта, печени, почек и иммунной системы и гормональные изменения и нарушения. Благоприятные питательные и терапевтические эффекты силикатов, вероятно, распространяются и на других животных, в частности, на других млекопитающих.

Силикаты используют в качестве пероральной питательной добавки, несмотря на то, что состав, обеспечивающий эффективное усваивание (всасывание) после введения дозы, не так просто получить. Кремний во встречающейся в природе неорганической форме растворяется в виде ортокремниевой кислоты. Тем не менее, его концентрация, например, в питьевой воде, должна быть относительно низкой ( $\leq 1,7$  мМ), так как в обычных условиях это значение соответствует максимальной равновесной растворимости водных силикатов при  $\text{pH} < 9$ , при котором не происходит полимеризация частиц, которые постепенно конденсируются и/или увеличиваются в размерах и в последствии плохо перерастворяются. Такие характеристики препятствуют разработке пищевых добавок, содержащих кремний, так как концентрированные формы не растворяются в кишечнике для обеспечения всасывания, но при этом разбавленные формы требуют использования больших количеств пищевых добавок (например, 20-100 мл/день).

Обычно для связывания и увеличения растворимости катионов/анионов, которые осаждаются при физиологическом рН, используют определенные химические фрагменты, такие как лиганды, но к силикату это неприменимо, так как его мономер, как правило, имеет повышенную аффинность сам к себе (т.е. претерпевает самоагрегацию), но не к другим молекулам, и при увеличении концентрации кремния подавление его самоагрегации в водном растворе становится все более затруднительным. Это привело к появлению альтернативных стратегий получения биодоступных композиций на основе силикатов.

Кроме того, тем не менее, намеренно или случайно, исследователи стали изучать биологические эффекты осажденных композиций на основе силикатов. Например, было изучено действие на клетки нано- и микро-частиц полимерных силикатов.

В заявке на патент США US 2011/0229577 (Керек (Kerek)) описаны частицы кремниевой кислоты, имеющие оболочечную структуру, где частицы конденсируют в условиях, когда рН реакционной смеси сначала понижают и затем увеличивают, что приводит к получению указанной композиции при рН 2,1 или при рН более 9,2. Согласно описанию силикатные композиции, предложенные в заявке на патент США US 2011/0229577, имеют низкую токсичность в клеточных культурах *in vitro*, а также являются ингибиторами кальциевой АТФазы (кальциевый насос) и вызывают апоптоз всех типов клеток. Сообщается об использовании указанных конденсированных силикатов для уменьшения размера опухолей.

Композиции на основе оксида кремния, стабилизированные от прохождения агломерации за счет использования больших количеств холина, реализуются в качестве пищевой добавки и описаны как "ортокремниевая кислота, стабилизированная холином" (Biosil™; ортокремниевая кислота, стабилизированная хлоридом холина, см. WO 95/21124 и Европейский патент EP 1371289 A).

В заявке на патент США US 2009/0130230 (Стэнли (Stanley)) описаны композиции на основе силикатов и их применение для лечения воспалительных состояний, рака, бактериальных и вирусных инфек-

ций и лечения инфицированных и неинфицированных ран. В указанном документе предполагается, что лечение происходит за счет активации врожденной иммунной системы.

В WO 2015/121666 (Medical Research Council) описаны композиции на основе наночастиц диоксида кремния, которые включают стабилизаторы, такие как полиолы, сахара и/или четвертичные аммониевые соли, такие как холин и карнитин. В частности, в WO 2015/121666 предложены способы получения стабилизированной композиции на основе полимерных силикатов, содержащей полимерную кремниевую кислоту и наночастицы диоксида кремния, где контролируют полимеризацию силикатов и рост частиц, в результате чего полученные частицы имеют стабильный размер за счет регулирования комбинации концентрации силиката, pH и/или стабилизатора. Описано применение указанных композиций для лечения различных медицинских состояний и использование для восполнения уровня кремния.

T-лимфоциты представляют собой клетки адаптивной иммунной системы, непосредственно отвечающие за организацию (CD4+ T-хелперные клетки) и осуществление (CD8+ цитотоксические T-клетки) удаления инфицированных и раковых клеток из организма. Таким образом, они составляют ключевую часть иммунной системы. Поликлональная активация T-клеток человека силикатами *in vitro* впервые была описана в 1994 году (Ueki et al., 1994), но, несмотря на имеющиеся подтверждения связи силикатов с активацией T-клеток при состояниях, таких как силикоз, уровень, структура и степень взаимодействия с T-клетками и механизм действия, определяющий взаимодействие силикатов и T-клеток, до конца не выяснены (Hayashi et al., 2010, Lee et al., 2012, Kusaka et al., 2014).

#### **Краткое описание изобретения**

В целом, настоящее изобретение основано на том факте, что композиции, содержащие частицы диоксида кремния, также называемые полимерным диоксидом кремния или полимерами на основе диоксида кремния, в частности, структуры диоксида кремния, имеющие средний размер, определенный стандартными способами измерения размеров частиц, от 0,5 нм до 20 нм, можно применять для активации лимфоцитов в культуре или в цельной крови. Этот наблюдаемый впервые технический эффект открывает возможность использования активации T-клеток в качестве маркера и биомаркера эффективности лечения рака, инфекции и другого хронического заболевания с применением диоксида кремния. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что частицы диоксида кремния связываются с рецепторами T-клеток, частично активируя их, например, что может быть обнаружено по увеличению экспрессии CD69 и/или CD25. Это означает, что T-клетки активируются, когда они встречаются со своим распознанным антигеном (например, раковой клетки или инфицированной клетки). Это означает, что T-клетки с меньшей вероятностью будут переходить в спящую форму, и активацию, таким образом, можно использовать для устранения истощения T-клеток, индуцируемого при раковых или определенных хронических заболеваниях, в ветеринарной медицине и медицине человека.

Обычно все первичные частицы с диаметром менее 100 нм в одном направлении описывают термином "нано-", но при этом по объему частицы с диаметром 1 и 100 нм могут различаться в миллион раз. Кроме того, большинство исследователей изучают агрегаты и агломераты, которые являются просто "наноструктурированными". Истинно диспергированные наночастицы гораздо хуже изучены, и к частицам с диаметром менее 10 нм (т.е. в диапазоне размеров белков) уделялось относительно небольшое внимание с точки зрения биомедицинского применения. Например, в крупных исследованиях было показано, что частицы диоксида кремния (-Si-O-Si-, описываемые как SiO<sub>2</sub> в наиболее конденсированной форме) проявляют различную активность в отношении клеток в зависимости от размера и кристалличности от благоприятной активности аморфных (слабо конденсированных) крупных частиц и до крайне провоспалительной активности кристаллического кварца - эффект, который частично имитируется наночастицами диоксида кремния независимо от кристалличности. Тем не менее, было проведено несколько исследований ультрадисперсных частиц диоксида кремния (с диаметром менее 10 нм). Несмотря на недостаток данных, ультрадисперсные частицы диоксида кремния являются общедоступными, так как они образуются, если концентрации водного мономера Si(OH)<sub>4</sub> превышают примерно 1,7 mM общего [Si]. Стэнли с соавторами (Stanley et al.) показали, что раковые заболевания могут быть излечены с использованием полученных смесей указанных "сверхнасыщенных" силикатных препаратов. Керек (Kerek) также утверждает, что ультрадисперсные силикатные частицы могут подходить для лечения раковых заболеваний, и предлагает список различных возможных путей их синтеза.

Соответственно, согласно первому аспекту в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая частицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр от 0,5 до 20 нм, для применения в способе активации T-лимфоцитов при терапии субъекта/индивидуума, где активация T-лимфоцитов характеризуется увеличением экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах. Например, предпочтительно увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 составляет по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80%, по сравнению с контролем на исходном уровне без стимуляции. Клеточные исследования для определения экспрессии CD69 и/или CD25 с применением моноклональных клеток периферической крови (МКПК) описаны в приведенных ниже примерах, при этом альтернативные исследования указанных биомаркеров будут понятны специалистам в данной области техники.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, в целом, активация Т-лимфоцитов может быть обеспечена при использовании композиций на основе частиц диоксида кремния, описанных в настоящем документе, но не композиций, описанных в уровне техники, таких как композиции, полученные согласно описанию Керека (см. выше) или композиции на основе ортокремниевой кислоты, стабилизированной холином (Biosil™).

В общем случае, Т-лимфоциты, активируемые при контакте с композициями на основе наночастиц диоксида кремния, применяемыми в настоящем изобретении, представляют собой Т-клетки, такие как Т-хелперные клетки, цитотоксические Т-клетки, цитотоксические естественные Т-киллеры или гамма-дельта Т-клетки. Это подтверждается в экспериментах с использованием Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических (CD8+) Т-клеток. В качестве альтернативы или в дополнение, активация Т-лимфоцитов увеличивает экспрессию одного или более дополнительных маркеров активации Т-клеток, выбранных из CD40L, LAP/GARP и/или FoxP3.

CD25 (кластер дифференцировки 25) представляет собой альфа-цепь рецептора IL-2. Он представляет собой трансмембранный белок I типа, присутствующий в активированных Т-клетках.

CD69 (кластер дифференцировки 69) представляет собой человеческий трансмембранный белок лектин типа C. Активация Т-лимфоцитов и естественных Т-киллеров (NKT) *in vivo* и *in vitro* индуцирует экспрессию CD69.

Лиганд CD40 или CD40L, также называемый CD154, представляет собой белок, который, главным образом, экспрессируется в активированных Т-лимфоцитах и является членом супер семейства молекул ФНО.

GARP (преобладающий повтор гликопротеина А), также известный как LRRC32 (белок 32, содержащий повторы, богатые лейцином), представляет собой белок, который существенно важен для поверхностной экспрессии латентного TGF- $\beta$  в тромбоцитах и активированных FOXP3<sup>+</sup> регуляторных Т-клетках. Повышенная экспрессия GARP и ассоциированного с латентностью пептида (LAP) являются показателями активации и распространения Т-лимфоцитов регуляторного типа (Treg).

FoxP3 (белок семейства Forkhead P3), также известный как скурфин, представляет собой белок, задействованный в ответе иммунной системы. Член семейства белков FOX, FOXP3, вероятно, действует как ключевой регулятор регуляторного пути при развитии и функционировании Т-клеток регуляторного типа (Treg).

В качестве альтернативы или в дополнение, в некоторых случаях активация лимфоцитов может быть выявлена по увеличению экспрессии IFN- $\gamma$ . В экспериментах, описанных в настоящем документе, дополнительно показано, что несмотря на активацию лимфоцитов, композиции по существу не индуцируют их пролиферацию.

В данной области техники хорошо известно, что существует равновесие между растворимыми кремниевыми кислотами и композициями силикатов с увеличивающейся степенью конденсации. Соответственно, согласно настоящему изобретению "стабилизированная композиция на основе полимерных силикатов" включает полимерную кремниевую кислоту и наночастицы силикатов, имеющие свойства, описанные в настоящем документе, а также растворимые формы кремниевой кислоты и поликремниевой кислоты, которые находятся в равновесии в композиции или в составе, содержащем композицию.

В данной области техники появляется все больше данных, которые позволяют предположить, что кремниевая кислота благоприятно влияет на здоровье и предупреждение или излечение заболеваний у человека и других животных. В общем случае, композиции согласно настоящему изобретению содержат композиции на основе полимерных силикатов, в которых естественная склонность наночастиц силикатов к росту с образованием частиц полисиликатов и силикатов высшего порядка подавляется за счет включения веществ, таких как органические соединения, которые могут действовать в качестве замедлителей роста, т.е. подавляют естественную склонность частиц поликремниевой кислоты к росту с образованием гелей и более конденсированных частиц или полимеров силикатов и частиц с более крупным размером по сравнению с желательным. Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что согласно некоторым аспектам этот подход означает, что композиции являются стабильными при физиологически приемлемом pH, в частности, при нейтральном или слабокислом pH или слабощелочном pH.

Дополнительное преимущество способа, описанного в настоящем документе, заключается в том, что за счет селективного контролирования pH, концентрации кремния и концентрации стабилизатора во время синтеза можно регулировать размер частиц от небольших полимеров с диаметром менее 0,5 нм до 10 или 20 нм в зависимости от желаемого размера частиц, и затем можно стабилизировать их в соответствии с изобретением для обеспечения возможности введения субъекту или животному частиц с выбранным размером. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что размер частиц относится к диапазону размеров, и числовое значение, указанное в настоящем документе, относится к среднему диаметру, чаще всего к среднему диаметру указанной партии частиц.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложено применение композиции, содержащей частицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр от 0,5 до 20 нм, в получении лекарственного средства для активации Т-лимфоцитов для терапии субъекта/индивидуума, где активация

T-лимфоцитов характеризуется увеличением экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ определения эффективности композиции на основе частиц диоксида кремния при терапевтическом введении субъекту или индивидууму, включающий:

(a) приведение образца T-лимфоцитов в контакт с композицией на основе частиц диоксида кремния;

(b) определение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах, присутствующих в образце; и

(c) отнесение композиций на основе частиц диоксида кремния, которые обеспечивают увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах, к подходящим для применения в терапии.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложено исследование для определения эффективности композиции на основе частиц диоксида кремния при терапевтическом введении субъекту или индивидууму, включающее:

(a) приведение образца T-лимфоцитов в контакт с композицией на основе частиц диоксида кремния;

(b) определение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах, присутствующих в образце;

(c) измерение или количественное определение экспрессии CD69 и/или CD25 по сравнению с контрольным значением, и, если экспрессия CD69 и/или CD25 увеличена по сравнению с контрольным значением, то выбор композиции на основе частиц диоксида кремния в качестве подходящей для терапевтического введения.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ определения эффективности терапии, включающей введение композиции на основе частиц диоксида кремния, или протокола введения субъекту или индивидууму, включающий:

(a) приведение образца T-лимфоцитов, полученного у субъекта или индивидуума, которому проводят лечение с использованием композиции на основе частиц диоксида кремния или в соответствии с протоколом введения, в контакт с указанной композицией;

(b) определение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах, присутствующих в образце; и

(c) отнесение субъекта или индивидуума, у которого наблюдается увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах на стадии (b), к успешно излеченному композицией на основе частиц диоксида кремния или согласно протоколу введения; или

(d) выявление субъекта или индивидуума, у которого не наблюдается увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах на стадии (b), и модификацию композиции на основе частиц диоксида кремния или протокола введения субъекту или индивидууму;

(e) необязательно повторное проведение стадий (a)-(d) до успешного излечения субъекта или индивидуума при использовании композиции на основе частиц диоксида кремния или в соответствии с протоколом введения.

В исследованиях и способах, приведенных в настоящем документе, увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах определяют относительно стандартного значения, например, контроля на исходном уровне без стимуляции.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложено применение экспрессии CD69 и/или CD25 в T-лимфоцитах в качестве маркеров или биомаркеров терапевтической эффективности композиций на основе частиц диоксида кремния.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложено устройство для получения композиции на основе диоксида кремния для терапевтического применения, содержащее:

первый контейнер, содержащий раствор силиката с  $\text{pH} > 10,5$ , второй контейнер, содержащий кислый буферный раствор;

средства контролирования потока для контролирования потока раствора силиката и кислотного буферного раствора; и

выходное отверстие, соединенное посредством текучих сред с первым и вторым контейнерами, для доставки композиции на основе коллоидного диоксида кремния, в результате чего два раствора смешиваются перед введением субъекту.

В одном из вариантов реализации устройство, которое применяют в периодическом способе синтеза композиции на основе диоксида кремния, дополнительно содержит камеру для смешения, соединенную посредством текучих сред с первым и вторым контейнерами, для смешения растворов для получения композиции на основе коллоидного диоксида кремния. В качестве альтернативы, если устройство предназначено для поточного синтеза композиций на основе диоксида кремния согласно настоящему изобретению, смешение растворов может происходить *in situ* при их доставке, например, в капельнице перед введением субъекту.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения устройство может быть предназначено для терапии T-лимфоцитами *ex vivo*. Согласно указанному аспекту устройство может дополнительно содержать камеру для приведения биологического образца, содержащего T-лимфоциты, полученного у субъекта, в контакт с композицией на основе коллоидного диоксида кремния для активации T-лимфоцитов для терапии, и/или средства доставки образца, содержащего T-лимфоциты, выделенного у

субъекта, в контактную камеру и возвращение активированных Т-лимфоцитов в организм субъекта.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен набор, содержащий (i) первый контейнер, содержащий раствор силиката с  $\text{pH} > 10,5$ , и (ii) второй контейнер, содержащий кислый буферный раствор, и (iii) инструкции по смешению раствора силиката и кислого буферного раствора для получения терапевтически активной композиции на основе коллоидного диоксида кремния, имеющей  $\text{pH}$  от 4,0 до 8,5, более предпочтительно от 4,0 до 6,5. Предпочтительно кислый раствор содержит хлороводородную кислоту, карбоновую кислоту, такую как лимонная кислота, или кислую аминокислоту, такую как глицин.

Далее варианты реализации настоящего изобретения будут описаны в качестве примера без ограничений при помощи прилагаемых фигур. Тем не менее, различные дополнительные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения будут понятны специалистам в данной области техники после изучения настоящего описания.

"И/или" при использовании в настоящем документе следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных отличительных признаков или компонентов совместно друг с другом или по отдельности. Например, "А и/или В" следует рассматривать как конкретное описание каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как и в случае, если бы каждый вариант был отдельно указан в настоящем документе.

Если по контексту не указано иное, описания и определения отличительных признаков, приведенные выше, не ограничены каким-либо конкретным аспектом или вариантом реализации и в равной степени относятся ко всем описанным аспектам и вариантам реализации.

### Краткое описание фигур

Фиг. 1. Активация Т-клеток композициями на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению и наночастицами диоксида кремния, синтезированными согласно примеру 4 ( $\text{Si}(\text{OMe})_4$ ) в завке Керека (US 2011/0229577). Клетки обрабатывали наночастицами, активацию оценивали через 24 ч.

Фиг. 2. Активация Т-клеток композициями на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению и  $\text{ch-OSA}^{\text{®}}$  (ортокремниевая кислота, стабилизированная холином,  $\text{BioSil}^{\text{TM}}$ ).

Фиг. 3. Экспрессия  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  под действием композиций на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению по сравнению с композицией Керека.

Фиг. 4. Экспрессия  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  под действием композиций на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению по сравнению с композицией Керека (+положительный контроль, SEB).

Фиг. 5. Экспрессия  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  под действием композиций на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению по сравнению с  $\text{Biosil}^{\text{TM}}$ .

Фиг. 6. Экспрессия  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  под действием композиций на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению по сравнению с  $\text{Biosil}^{\text{TM}}$  (+ положительный контроль, SEB).

Фиг. 7. Активация  $\text{CD4}$  и  $\text{CD8}$  Т-клеток под действием ультрадисперсных наночастиц диоксида кремния различного размера, полученных путем нейтрализации  $\text{pH}$  ( $\text{pH}$  7) щелочного раствора силиката натрия до конечной концентрации 23–40  $\text{mM Si} \pm$  хлорид натрия и инкубации в течение ~20 ч (до получения дисперсии  $> 3$  нм) или доведения 500  $\text{mM}$  щелочного раствора силиката до  $\text{pH}$  0,8–1 и инкубации в течение ~20 ч (дисперсии  $< 3$  нм) перед добавлением в клеточные культуры ( $n = > 8$ ). Указан средний диаметр частиц ( $\text{DV}_{0,5}$ ).

Фиг. 8. Активация различных типов клеточной линии Th под действием ультрадисперсных наночастиц диоксида кремния, которые называют "HS-7", полученных путем нейтрализации  $\text{pH}$  ( $\text{pH}$  7) щелочного раствора силиката натрия до конечной концентрации 23  $\text{mM Si}$  и инкубации в течение ~20 ч перед добавлением в клеточные культуры ( $n = 6-7$ ). Частицы имели средний диаметр ( $\text{DV}_{0,5}$ ) = 3,4–3,8 нм по результатам повторяющихся анализов.

Фиг. 9. Влияние сах. uSANS (a), uSANS in situ (b) и контроля с соответствующим носителем (c) на конфлюэнтность клеток HUVEC. Следует отметить, что данные для третьих исследуемых наночастиц диоксида кремния, называемых HS7, не могут быть показаны, так как они индуцировали токсичность в клетке (т.е. приводили к изменениям формы клеток и/или гибели клеток) после непродолжительной инкубации ( $< 1$  ч) во всех трех концентрациях (1, 2 и 4  $\text{mM Si}$ ), и после 4–5 ч инкубации большинство клеток погибало при 4  $\text{mM}$  концентрации. В последующих экспериментах с более низкими концентрациями HS7 (0,1, 0,25 и 0,5  $\text{mM Si}$ ) токсичность наблюдалась даже при 0,5  $\text{mM Si}$ .

Фиг. 10. Изменение уровня  $\text{pZap70}$  со временем указывает на быструю активацию Т-клеток, возникающую в результате взаимодействия наночастиц диоксида кремния с Т-клеточным рецептором, что приводит к фосфорилированию ZAP-70.

Фиг. 11. Химическая лабильность uSANS при хранении в кислотных условиях, определенная в молибдатном исследовании. Все материалы хранили при комнатной температуре или при  $4^{\circ}\text{C}$ . Стабилизированный сахарозой uSANS (сах. uSANS) хранили при  $\text{pH}$   $2,15 \pm 0,15$  или  $1,5 \pm 0,1$ , при этом нестабилизированные материалы (NS uSANS) хранили при  $\text{pH}$   $1,5 \pm 0,1$ . Более высокие значения ОП указывают на повышенную химическую лабильность (т.е. менее конденсированные силикаты).

Фиг. 12. Зависимость химической лабильности uSANS от времени после нейтрализации ( $\text{pH}$  7). Мо-

либдатное исследование использовали для сравнения лабильности растворимых силикатов ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) с uSANS перед (рН 2,3) и после нейтрализации (от t 0 ч до t 6 ч).

Фиг. 13. Химическая лабильность образованного *in situ* uSANS (40 мМ Si) после инкубации в течение различных периодов времени (от 1 мин до 1 ч).

### Подробное описание

#### Биологическая роль кремния и химия силикатов

Имеющиеся данные позволяют предположить, что кремниевые кислоты, как мономерные, так и полимерные, благоприятно влияют на здоровье и предупреждение или излечение заболеваний у человека и других животных. Тем не менее, как было описано выше, фундаментальная проблема в данной области техники заключается в том, что кремниевая кислота, мономер которой представляет собой  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , склонна к самоагрегации и при  $\text{pH} \leq 9,0$  и в концентрациях, превышающих максимальную растворимость водных силикатов (1,7 мМ при 25°C, см. фиг. 1 в Jugdaohsingh et al., выше), образует нерастворимые частицы. В данной области техники хорошо известно, что существует равновесие между растворимыми кремниевыми кислотами и силикатными частицами с увеличивающейся степенью конденсации, а именно, между моно-, ди- и три-кремниевыми кислотами, поликремниевыми кислотами и наночастицами диоксида кремния. Процесс роста из растворов кремниевой кислоты сопровождается изменением частиц, где отдельная частица увеличивается в размерах и изменяется во все большей степени (т.е. становится менее лабильной, растворимой и/или доступной для растворения), и, таким образом, все с меньшей вероятностью может превращаться обратно в  $\text{Si}(\text{OH})_4$  без добавления щелочи. Рост может включать полимеризацию, агрегацию, агломерацию, агрегацию или увеличение размеров из-за осаждения на их поверхности растворимых частиц. Рост поликремниевых кислот в конечном итоге приводит к образованию геля в подходящих условиях. Указанные факторы в значительной степени усложняют стабилизацию композиций силикатов при концентрациях, превышающих указанные значения для водных силикатов, и при физиологически значимых рН.

Введение силикатов, таким образом, сопровождается проблемами, так как с дозировкой необходимо доставлять кремний, требуемый для обеспечения желаемого эффекта с точки зрения концентрации и химической формы, при рН, совместимом с физиологически приемлемыми условиями, и таким способом, чтобы не допускать образования прочных наночастиц силикатов, которые могут оказывать нежелательное действие на состояние здоровья. Особенно следует отметить, что при введении дозировки в общем случае происходят три значимых изменения, вызванные физиологической средой. Во-первых, происходит растворение в физиологических жидкостях, во-вторых, изменяется рН, и, в-третьих, происходит изменение ионной силы. Суммарный эффект от этих факторов будет определять характеристики вводимого силиката.

#### Композиции на основе наночастиц диоксида кремния и активация Т-лимфоцитов

Авторы изобретения обнаружили, что композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению и более предпочтительно ультрадисперсные наночастицы диоксида кремния (диаметром <10 нм) могут стимулировать активацию Т-лимфоцитов, которая может быть измерена, например, по увеличению уровня маркеров CD25 и CD69 на поверхности Т-лимфоцитов. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что это происходит за счет прямого связывания наночастиц диоксида кремния с рецепторным комплексом CD3-Т-лимфоцитов (называемым в настоящем документе комплексом CD3-TCR). Важно отметить, что несмотря на то, что размер, вероятно, является одним из факторов, позволяющим предсказывать возможность активации Т-лимфоцитов композициями на основе наночастиц диоксида кремния, другие факторы также могут влиять на указанную характеристику. Например, ультрадисперсные наночастицы диоксида кремния, стабилизированные от прохождения агломерации высоким количеством холина, реализуются в качестве пищевой добавки и описаны как "ортокремниевая кислота, стабилизированная холином" (Biosil™; орто-кремниевая кислота, стабилизированная хлоридом холина, см. WO 95/21124 и Европейский патент EP 1371289 A), но при этом они не стимулируют активацию Т-лимфоцитов в проведенных авторами исследованиях (см. фигуры 2 и 5). В другом примере наночастицы диоксида кремния, описанные Кереком (заявка на патент США US 2011/0229577), полученные в качестве сравнительного образца для примера 4 в настоящем документе, очень слабо индуцировали активацию CD4 Т-лимфоцитов и в незначительной степени индуцировали активацию CD8 Т-лимфоцитов по сравнению с некоторым свежесоздаваемыми наночастицами диоксида кремния, полученными путем регулирования рН щелочных растворов силикатных солей (см. фиг. 1, 3 и 4). В дополнительном примере наночастицы диоксида кремния, стабилизированные сахарозой, описанные в WO 2015/121666, активировали CD4 и CD8 Т-лимфоциты таким же образом, что и нестабилизированные частицы. Таким образом, согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложено исследование для определения эффективности композиции на основе частиц диоксида кремния в отношении стимуляции Т-лимфоцитов, так как она не может быть определена в рамках простых физико-химических исследований. В свою очередь, это может позволить подбирать активность наночастиц диоксида кремния, включая любое желательное селективное действие на CD8 и CD4 Т-лимфоциты, что может позволить проводить более эффективную направленную терапию с активацией Т-

лимфоцитов.

Кроме того, авторы изобретения также обнаружили, что специфические подтипы или "клеточные линии" Т-лимфоцитов могут активироваться одновременно при воздействии ультрадисперсных наночастиц диоксида кремния. Например, CD4+ Т-хелперные (Th) клетки удобно делить на несколько различных клеточных линий Th в зависимости от типа иммунного ответа, в регуляции которого они задействованы (Geginat et al., 2015). Так называемые Th1 CD4+ хелперные клетки могут опосредовать цитотоксический ответ Т-лимфоцитов и активировать моноциты, они характеризуются выработкой IFN- $\gamma$  (Geginat et al., 2015). В то же время, так называемые регуляторные CD4+ Т-хелперные клетки (Treg) отвечают за подавление иммунных ответов, и они могут быть идентифицированы по наличию белка группы Forkhead P3 (FoxP3) и поверхностной экспрессии LAP и GARP (Sakaguchi et al., 2010, Gauthy et al., 2013; Stockis et al., 2009). При этом, так называемые Th2 CD4+ Т-хелперные клетки могут отвечать за опосредование, например, В-клеточных ответов. Лиганд CD40, также называемый CD154, может экспрессироваться в Th2 клетках и активировать CD40 рецептор в В-клетках, что способствует пролиферации и выживаемости В-клеток (Crotty, 2015; Elgueta et al., 2009).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Т-лимфоциты из нескольких типов клеточных линий могут быть восприимчивы к активации Т-лимфоцитов указанными ультрадисперсными наночастицами диоксида кремния (фиг. 8). Это позволяет использовать Т-лимфоциты для различных терапевтических применений. Во-первых, можно использовать исследование для выявления специфических типов/форм наночастиц диоксида кремния, которые селективно воздействуют или поляризуют указанное воздействие в отношении одной линии Т-лимфоцитов, в результате чего регуляторные, Th1 или Th2 клетки можно предпочтительно выбирать во время лечения. Например, селективная активация Th1 клеток может быть желательной при раковых или вирусных заболеваниях. Селективная активация Treg может быть желательной при аутоиммунных или воспалительных заболеваниях.

Во-вторых, при долгосрочном введении активацию Т-лимфоцитов можно применять в терапевтических целях для достижения "истощения", другими словами, для обращения вспять активации и, таким образом, ослабления (деактивации) всех, или фактически выбранных, типов Т-лимфоцитов. Например, это может быть терапевтически эффективным при "воспалительном заболевании" независимо от того, является оно классическим аутоиммунным, таким как рассеянный склероз или ревматоидный артрит, классическим Th1-связанным, таким как болезнь Крона или ревматоидный артрит, или Th2-связанным, таким как астма или язвенный колит. Аутоиммунные заболевания могут иметь Th1- или Th2-поляризацию, поэтому ревматоидный артрит указан дважды.

В-третьих, применение частиц диоксида кремния для активации или истощения всех или выбранных Т-лимфоцитов можно использовать совместно с сопутствующим проведением терапии, которая подавляет или усиливает специфическую клеточную линию или фенотип Т-клеток, и тем самым выбирать тип ответа. Например, секвенирование клеточной линии Treg Т-лимфоцитов при терапии рака с использованием циклофосфида (Becker et al., 2013) обеспечивает селективный "рост" эффекторных линий Т-лимфоцитов при проведении терапии наночастицами диоксида кремния, что можно использовать в режиме, в котором предотвращается долгосрочное истощение Т-лимфоцитов. Совместное введение для указанных целей можно проводить до и/или во время и/или после введения наночастиц диоксида кремния и может включать использование одного или более агентов.

Парентеральная доставка терапевтических наночастиц диоксида кремния может быть желательной, так как лишь небольшая часть всасывается в желудочно-кишечном тракте (Jugdaohsingh et al., 2000). Считается, что внутривенное введение может быть особенно предпочтительным (WO 2015121666). Тем не менее, для этого необходимо, чтобы наночастицы диоксида кремния, которые можно вводить путем инъекции в высоких концентрациях для обеспечения эффективных терапевтических доз в кровотоке, имели минимальную токсичность в отношении клеток эндотелия, выстилающих сосудистую систему. Действительно, так называемые частицы uSANS, одна из форм наночастиц диоксида кремния, описанные в WO 2015/121666, имеют минимальную прочность и, таким образом, являются менее токсичными для клеток эндотелия по сравнению с теми, что были описаны ранее в заявке на патент США US 2009/0130230, автор Стэнли (называемыми в настоящем документе частицами HS7). Частицы HS 7 являются относительно более токсичными в концентрациях более 0,5 mM Si, что тем самым снижает возможность их клинического применения в терапевтических дозах. Тем не менее, несмотря на лучшую переносимость по сравнению с частицами HS7, частицы uSANS все равно имеют умеренную токсичность в отношении клеток эндотелия (фиг. 9). Тем не менее, авторы изобретения обнаружили очень быстрое взаимодействие наночастиц диоксида кремния и TCR, что было продемонстрировано по быстрому фосфорилированию дзета-цепь-ассоциированной протеинкиназы 70 (pZap70) Т-лимфоцитов под действием наночастиц диоксида кремния (фиг. 10), это означает, что экстракорпоральная обработка крови или выделенных клеток является эффективным способом доставки наночастиц диоксида кремния. В частности, клетки, в некоторой степени выделенные из ткани или биологической жидкости или присутствующие в цельной крови, не требуется удалять из организма на продолжительный период времени, их можно обрабатывать наночастицами диоксида кремния и повторно вводить путем инъекции для терапевтического применения. Это может облегчать повреждение эндотелия, так как связывание иммунных клеток и бел-



ков наночастицами диоксида кремния и частичное растворение наночастиц диоксида кремния минимизируют воздействие на клетки эндотелия и повреждение наночастицами диоксида кремния при их повторном введении.

Соответственно, согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая частицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр от 0,5 до 20 нм, для применения в способе активации Т-лимфоцитов при терапии субъекта/индивидуума, где способ включает получение композиции частиц диоксида кремния способом синтеза *in situ* перед введением субъекту. Как и в других аспектах настоящего изобретения, активация Т-лимфоцитов в общем случае характеризуется увеличением экспрессии CD69 и/или CD25 в Т-лимфоцитах.

В качестве альтернативы или в дополнение, в настоящем изобретении предложена композиция для применения в способе Т-клеточной терапии, который включает получение образца, содержащего Т-клетки, у субъекта, приведение образца Т-клеток в контакт с композицией на основе диоксида кремния согласно настоящему изобретению для активации Т-клеток в образце и введение (т.е. возвращение) активированных Т-клеток субъекту.

В качестве дополнительного варианта реализации настоящего изобретения авторы изобретения обнаружили, что uSANS, имеющие минимальную токсичность, могут быть получены способом синтеза *in situ*, т.е. uSANS, которые получают практически непосредственно перед клиническим применением в рамках периодического синтеза или поточного синтеза. Указанные uSANS *in situ* могут быть получены периодическим способом синтеза в квазинейтральных буферных системах. Синтез *in situ* включает применение системы двух растворов: (i) раствор силиката при  $\text{pH} > 10,5$  (т.е. силикат является растворимым, но не коллоидным), который нейтрализуют (ii) кислым буферным раствором (содержащим карбоксилат, такой как цитрат, или аминокислоту, такую как глицин). Смешение двух растворов приводит к умеренно кислым  $\text{pH}$  от 4,0 до 6,5 (и более предпочтительно  $\text{pH}$  от 5,0 до 6,0), после чего быстро образуются кластеры/коллоиды силикатов (т.е. наночастицы диоксида кремния). Указанные коллоиды постепенно становятся более конденсированными, и их можно вводить при заданном уровне лабильности. Предпочтительно инкубацию проводят при  $\text{pH}$  от 4,0 до 6,5 в случае медленной инкубации (периодический синтез *in situ*) или при  $\text{pH}$  от 6,5 до 8,5 в случае быстрой инкубации (поточный синтез *in situ*). Концентрация силикатов во время инкубации предпочтительно находится в диапазоне от 10 до 100 мМ, предпочтительно от 20 до 60 мМ. Продолжительность инкубации предпочтительно составляет от 15 до 60 мин в случае периодического синтеза *in situ*, или от 10 с до 5 мин в случае поточного синтеза *in situ* (т.е. продолжительность от момента смешения до внутривенного введения). Например, 30-минутная инкубация при смешении кислоты и силикатных компонентов подходит для периодического синтеза при (i) 40 мМ Si, (ii) комнатной температуре, (iii)  $\text{pH}$  5,3 (измеренный как  $\text{pH}$  4,0-5,0 при помощи тест-полосок  $\text{pH}$ ). Кроме того, в качестве иллюстрации для поточного синтеза может требоваться даже 1-минутная инкубация (в реакционной трубке) при комнатной температуре и использованием 50 мМ Si (при смешении двух компонентов) при  $\text{pH}$  7,0-8,0. Важно отметить, что авторы настоящего изобретения обнаружили, что условия синтеза можно тонко настраивать для обеспечения оптимальной лабильности частиц после проведения молибдатного исследования, описанного в настоящем документе (исследование лабильности).

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения uSANS *in situ* могут быть получены в поточной системе. Это является предпочтительным, так как поточная система может быть соединена с системой внутривенной доставки или системой выделения/обработки клеток, что тем самым минимизирует необходимость работы с образцом (и вероятность его загрязнения) между синтезом и доставкой. В указанном поточном способе синтеза два раствора смешивают в одной линии: (i) раствор силиката с  $\text{pH} > 10,5$  (т.е. растворимый, но не коллоидный, силикат) и (ii) кислый раствор. При объединении двух потоков достигается практический нейтральный  $\text{pH}$  ( $\text{pH}$  6,5-8,0), что приводит к быстрому образованию лабильных силикатов, которые можно непосредственно вводить субъекту или экстракорпорально в клетки субъекта. Важно отметить, что указанную систему поточного синтеза можно очень легко регулировать. Например, можно получать более конденсированные частицы (если это требуется) за счет применения реакционных трубок с увеличенной длиной, что приводит к увеличению продолжительности инкубации (в реакционной трубке) перед инъекцией субъекту или в устройстве.

Важно отметить, что uSANS *in situ* так же эффективно активируют Т-клетки, как и наилучшие стандартные uSANS, но являются менее токсичными. В частности, при непродолжительном воздействии, характерном для внутривенной доставки, при которой происходит быстрое растворение активного вещества, uSANS *in situ* вообще не проявляют токсичность даже в максимальной исследуемой концентрации (4 мМ; фиг. 9). Указанные частицы должны присутствовать в продолжительном контакте с клетками эндотелия, чтобы вызывать их повреждение, что не происходит согласно протоколам лечения. Дополнительное преимущество системы uSANS *in situ* заключается в том, что срок годности составляющих его растворов является практически "бесконечным", так как и буферный раствор (например, цитратный), и раствор силикатов являются исключительно стабильными. Это отличает указанную систему от стандартных uSANS, лабильность которых постепенно уменьшается, что может быть продемонстрировано в молибдатном исследовании, несмотря на стабилизацию при хранении при низких  $\text{pH}$  и обязательно наличие стабилизаторов (фиг. 11). Дополнительное ограничение стандартных uSANS заключается в том, что

из-за их низкого pH указанные растворы необходимо нейтрализовать перед введением (например, перед в.в. доставкой). Тем не менее, при нейтрализации лабильность стремительно уменьшается, что является клинически нежелательным признаком. Действительно, указанный эффект можно наблюдать непосредственно после нейтрализации, и через 12 мин коллоиды становятся недоступными для клинического использования (фиг. 12).

#### Композиции на основе наночастиц диоксида кремния

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим наночастицы диоксида кремния в виде частиц диоксида кремния, имеющих средний диаметр от 0,5 нм до 20 нм, необязательно стабилизированным одним или более стабилизаторами. Факты, описанные в настоящей заявке, показывают, что композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению можно применять в способах активации Т-клеток и, таким образом, для терапии субъекта или индивидуума, в частности при лечении рака и инфекций, что более подробно обсуждается ниже.

В качестве альтернативы, композиции, содержащие стабилизированные композиции на основе наночастиц диоксида кремния, которые включают стабилизаторы, и способы их получения описаны в WO 2015/121666 (Medical Research Council), содержание которой включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. Примеры стабилизаторов, подходящих для применения в композициях на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению, включают полиолы, сахара и/или четвертичные аммониевые соли, такие как холин и карнитин. В частности, в WO 2015/121666 предложены способы получения стабилизированной композиции на основе полимерного силиката, содержащей полимерную кремниевую кислоту и наночастицы диоксида кремния, в которых контролируют полимеризацию силикатов и рост размера частиц, и полученные частицы имеют стабильный размер за счет регулирования комбинации концентрации силиката, pH и/или стабилизатора. В некоторых вариантах реализации композиции могут быть дополнены катионами металлов, так как они могут индуцировать рост размера частиц и могут обеспечивать композиции с подходящими дополнительными свойствами.

Композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению содержат растворимую поликремниевую кислоту и наночастицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр 20 нм или менее, и в некоторых случаях средний диаметр, который более предпочтительно составляет менее 10 нм, более предпочтительно менее 5 нм, 4 нм, 3 нм, 2 нм, 1 нм или 0,5 нм. В некоторых вариантах реализации размер частиц может находиться в диапазоне от примерно 0,5 нм до примерно 2 нм или от примерно 0,5 нм до примерно 3 нм или от примерно 0,5 нм до примерно 4 нм или от примерно 0,5 нм до примерно 5 нм или от примерно 0,5 нм до примерно 10 нм или от примерно 0,5 нм до примерно 15 нм или от примерно 0,5 нм до примерно 20 нм или от примерно 5 нм до примерно 20 нм или от примерно 5 нм до примерно 15 нм или от примерно 5 нм до примерно 10 нм или от примерно 10 нм до примерно 15 нм или от примерно 10 нм до примерно 20 нм или от примерно 15 нм до примерно 20 нм. Предпочтительные композиции включают частицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр от 0,5 до 10 нм, и частицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр от 2 до 5 нм.

То, что полимерная кремниевая кислота и/или наночастицы диоксида кремния являются нерастворимыми, может быть подтверждено косвенными методами в исследовании с использованием молибденовой кислоты, упомянутом выше, так как оно позволяет определять растворимую фракцию кремниевой кислоты. В общем случае, вещества находятся в равновесии с растворимой кремниевой кислотой, и типичная концентрация растворимой кремниевой кислоты составляет примерно <2 мМ при pH < 9,0. Композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению могут отличаться от более конденсированных форм силикатов, включая более крупные наночастицы (например, предпочтительно имеющие средний размер более 50 нм и более предпочтительно более 20 нм), гели поликремниевой кислоты и диоксид кремния (SiO<sub>2</sub>), наиболее конденсированную форму кремниевой кислоты, в которой группы -ОН практически отсутствуют. Размер частиц поликремниевых кислот может быть определен путем динамического рассеяния света, предпочтительно измерения следует проводить в свежеприготовленных образцах, если они не стабилизированы. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что поликремниевые кислоты находятся в равновесии с другими частицами силикатов. Например, в зависимости от фактических условий могут быть включены пониженные количества растворимой кремниевой кислоты.

Композиции наночастиц диоксида кремния, применяемые в настоящем изобретении, в общем случае являются водосодержащими, то есть, вода присутствует во время их синтеза и в некоторой степени (например, по меньшей мере 5 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 10 мас.%, по меньшей мере 20 мас.% воды) сохраняется в конечном составе, т.е. материалы не сушат или не нагревают значительно перед включением в состав и последующим введением. Тем не менее, должно быть очевидно, что стабилизаторы или другие вспомогательные агенты можно применять в настолько высоких концентрациях, что происходит вытеснение молекул воды из частиц силикатов. Таким образом, вода может быть удалена, даже если состав не сушат.

Стабилизацию композиций на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению предпочтительно проводят на период от момента синтеза до хранения, включения в состав и/или введения (например, при нежелательном отсутствии агломерации).

Композиции на основе наночастиц диоксида кремния, применяемые согласно настоящему изобретению, являются метастабильными, то есть, композиции имеют стабильность, которая удовлетворяет предполагаемому способу применения с точки зрения срока годности. В качестве иллюстрации, композиции на основе полимерных силикатов согласно настоящему изобретению предпочтительно являются стабильными при хранении, например, сохраняют стабильность 3 месяца или более, более предпочтительно 6 месяцев или более, более предпочтительно 12 месяцев или более и более предпочтительно 24 месяца или более. Таким образом, композиции на основе полимерных силикатов согласно настоящему изобретению можно получать путем частичной конденсации молекул кремниевой кислоты (или силиката). Указанные материалы являются метастабильными в виде отдельных неагрегированных кластеров или коллоидов.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиции на основе наночастиц диоксида кремния включают стабилизатор, предпочтительно сахар и/или полиалкиленгликоль. Сахара включают олигосахариды, состоящие из восьми моносахаридов или менее, такие как мономерные, димерные или тримерные сахара. Предпочтительным сахаром является сахароза. Максимальное количество мономерных звеньев в сахаре выбирают таким образом, чтобы его введение не вызывало иммунный ответ у субъекта, которому его вводят. Полиалкиленгликоли представляют собой семейство простых полиэфирных соединений, которое включает полиэтиленгликоль (ПЭГ) и полипропиленгликоль. Примеры стабилизаторов, представляющих собой сахара (сахариды), включают мономерные, димерные, тримерные и полимерные сахара (сахариды) или соответствующие сахарные спирты, такие как глюкоза, фруктоза, манноза, сахароза, трейт, эритрит, сорбит, маннит, галактит или адонит. В некоторых вариантах реализации, в которых стабилизатор представляет собой сахар, он представляет собой олигосахарид, отличный от лактозы. В некоторых вариантах реализации, в которых применяют сахарный спирт, он отличается от маннита. Применение сахаров в качестве стабилизаторов в композициях для введения внутрь является предпочтительным согласно настоящему изобретению, так как они безопасны для введения субъекту-человеку и животным.

В некоторых вариантах реализации можно применять комбинации более чем одного различного сахара или полиалкиленгликоля, например, двух, трех, четырех или пяти или более сахаров или полиалкиленгликолей, например, путем добавления их на стадии (а) и/или (b). Стабилизаторы на основе сахаров и/или полиалкиленгликолей в общем случае добавляют в концентрации от 0,01 М до 3,0 М и более предпочтительно от 0,03 до 2,0 М и наиболее предпочтительно от 0,1 М до 1,5 М. Специалисты могут проводить стандартные исследования для определения наилучшей комбинации сахаров и/или полиалкиленгликолей для любой данной ситуации.

Можно найти различия между стабилизированными композициями на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению и композициями, описанными в опубликованной заявке на патент США US2003/0206967 (Choi et al.), в которой описана композиция, содержащая метасиликат натрия, буру, тиосульфат натрия, карбонат калия и рафинированный сахар в воде. Это обеспечивает сильнокислотную композицию, имеющую рН примерно 13, что существенно отличается от рН стабилизированных композиций на основе полимерных силикатов согласно настоящему изобретению, рН которых предпочтительно составляет от 3,0 до 9,0, более предпочтительно от 3,0 до 8,0 и более предпочтительно от 5,5 до 7,5. Способ, применяемый для получения композиций согласно Чои с соавторами (Choi et al.), отличается от настоящего изобретения, так как согласно настоящему изобретению композиции получают путем понижения рН для получения стабильных силикатных полимеров. С учетом вышеуказанного, композиции на основе наночастиц диоксида кремния предпочтительно не содержат одно или более из метасиликата натрия, буры, тиосульфата натрия, карбоната калия и предпочтительно не включают буру. Предпочтительные композиции на основе наночастиц диоксида кремния могут не содержать холин и/или не содержать этанол и тем самым отличаются от Biosil™ и композиций на основе силикатов, описанных Керекком, соответственно.

Согласно другим аспектам в настоящем изобретении можно применять карбоновые кислоты в качестве стабилизаторов, и карбоновая кислота может представлять собой C<sub>2-10</sub> карбоновую кислоту, например, двухосновную карбоновую кислоту, такую как щавелевая кислота, малоновая кислота, глутаровая кислота, винная кислота, янтарная кислота, адипиновая кислота или пимелиновая кислота или их ионизированные формы (т.е. соответствующие карбоксилаты), такие как адипат, или, например, одноосновную карбоновую кислоту, такую как глюконовая кислота. Дополнительными примерами стабилизаторов являются двухосновные карбоновые кислоты, которые могут быть представлены формулой HOOC-R<sub>1</sub>-COOH (или их ионизированные формы), где R<sub>1</sub> представляет собой необязательно замещенную C<sub>1-10</sub> алкильную, C<sub>1-10</sub> алкенильную или C<sub>1-10</sub> алкинильную группу. В целом, применение карбоновых кислот, в которых R<sub>1</sub> представляет собой C<sub>1-10</sub> алкильную группу и более предпочтительно представляет собой C<sub>2-6</sub> алкильную группу, является предпочтительным.

Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению могут быть дополнительно стабилизированы путем добавления неводного растворителя, такого как спирт. Предпочтительным примером спирта является этанол. В качестве иллюстрации, неводный растворитель можно добавлять в количестве от

10 до 50% (об./об.) или от 20 до 50% (об./об.) или от 10 до 20% (об./об.). Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что в некоторых случаях комбинация сахарозы со спиртом была особенно эффективной при стабилизации композиций на основе наночастиц диоксида кремния.

Из последующего обсуждения стадий способов согласно настоящему изобретению специалистам в данной области станет понятно, что можно изменять порядок проведения некоторых стадий описанного выше способа и/или проводить некоторые стадии одновременно. Другие стадии являются необязательными, что указано выше и дополнительно объясняется ниже.

В процессе работы над настоящим изобретением авторы обнаружили, что на стабильность композиций на основе наночастиц диоксида кремния влияет ряд факторов, включая скорость понижения pH исходного щелочного раствора силиката, использование стабилизаторов, в частности, сахаров или полиалкиленгликолей, добавление катионов металлов и/или добавление неводного растворителя. В способах получения композиций на основе наночастиц диоксида кремния можно следовать указанным подходам, по отдельности или в комбинации, для получения композиций на основе наночастиц диоксида кремния, имеющих достаточную стабильность для применения, например, в качестве пищевой добавки или терапевтического агента.

В некоторых случаях, в частности, при получении ультрамельких частиц наносиликатов ("uSANS") скорость понижения pH щелочного раствора силиката может в значительной степени влиять на стабильность получаемых композиций на основе наночастиц диоксида кремния. Предпочтительно pH понижают (например, до pH 4,0 или 3,0 или менее) в течение периода менее 60 с, более предпочтительно менее 30 с, более предпочтительно менее 10 с или наиболее предпочтительно менее 5 с. Получение альтернативной композиции на основе частиц диоксида кремния HS-7 приведено ниже в примерах.

Концентрация щелочного раствора силиката предпочтительно должна составлять от 0,05 М до 1,5 М и более предпочтительно от 0,03 до 2,0 М и наиболее предпочтительно от 0,1 М до 1,0 М. Использование pH, превышающих 9,5, также является предпочтительным для сохранения растворимости силикатов, и предпочтительно на стадии (а) pH щелочного раствора силиката составляет примерно 10,5 или более и еще более предпочтительно примерно 11,5 или более. В конечных композициях на основе полимерных силикатов концентрация кремния может составлять 2,5 мМ или более, 5,0 мМ или более, 25 мМ или более, 30 мМ или более, 40 мМ или более, 50 мМ или более, 100 мМ или более, 250 мМ или более, 500 мМ или более. В конечных стабилизированных композициях на основе полимерных силикатов концентрация кремния может составлять 1,5 М или менее, 1,0 М или менее, 500 мМ или менее и находится в диапазоне между указанными нижним и верхним пределами.

В некоторых вариантах реализации пониженный pH может влиять на тип получаемых стабилизированных наночастиц силикатов. Как показано в примерах, uSANS или очень мелкие частицы, которые имеют средний диаметр 5 нм или менее, могут быть получены путем мгновенного понижения pH от значения, превышающего 10,0, до 3,0 или менее и обеспечивают концентрации применяемого кремния до 1 М. В качестве альтернативы, SANS или мелкие наночастицы имеют средний диаметр 10 нм или менее и могут быть получены путем понижения pH до примерно 7,4. В этом случае можно использовать более низкие концентрации, составляющие примерно 50 мМ или менее. Соответственно, пониженный pH может составлять 7,4 или менее или pH 3,0 или менее. Это позволяет получать uSANS при низких pH, как было описано, а при повышении pH выращивать uSANS до SANS с определенным размером частиц и затем стабилизировать размер путем повторного снижения pH, если это требуется. Необязательно на некоторой стадии указанного способа может требоваться стабилизатор. Указанные способы составляют важную часть данной области техники.

В некоторых случаях для долгосрочного хранения стабилизированных водных суспензий можно понижать pH и/или разбавлять суспензию. В качестве альтернативы или в дополнение, при долгосрочном хранении при нефизиологическом pH и перед введением субъекту суспензию наночастиц силиката можно доводить до физиологического pH и/или разбавлять и/или добавлять стабилизатор.

Композиции можно стабилизировать таким образом, чтобы размер наночастиц силикатов оставался достаточно стабильным (<20 нм) для предполагаемого применения. Например, в случае состава для внутривенного введения размер частиц в хранимом изначально растворе (например, при pH < 3 и 100 мМ Si) остается стабильным на протяжении периода хранения, после разбавления буферным в.в. раствором он остается стабильным в течение первых нескольких часов перед введением, а после введения частицы не вступают в агрегацию.

Методика периодического синтеза uSANS in situ (цитрат).

Получение маточных растворов.

Компонент А (HCl + лимонная кислота): (i) растворяли 0,307 г лимонной кислоты (ММ 192,124) в 180 мл воды UHP; (ii) добавляли 0,783 мл 37% HCl при перемешивании; (iii) доводили объем до 200 мл водой UHP.

Компонент В (80 мМ силикат натрия): разбавляли 2,56 мл силиката натрия (~6,25 М Si) в воде до конечного объема 200 мл.

Компонент С (солевой раствор; необязательный): 4,5 г NaCl растворяли в 45 мл воды UHP и довели конечный объем до 50 мл водой UHP.

Стерилизация компонентов А, В и С (необязательная): в стерильных условиях (в поточной камере) пропускали растворы компонентов через 0,22 мкм шприц-фильтр в стерильные контейнеры.

Получение коллоидов.

Стадия 1. Смешивали компонент А (2,5 мл) с компонентом В (2,5 мл). Итоговый рН составлял примерно 5,4 при измерении рН-электродом (тест-полоски рН 4,0-5,0).

Стадия 2. Инкубировали в течение 30 мин.

Стадия 3 (необязательная). После инкубации и непосредственно перед введением добавляли компонент С (0,425 мл) и перемешивали.

Методика поточного синтеза uSANS in situ (без буфера).

Получение маточных растворов.

Компонент А (HCl): разбавляли 1,2 мл 37% HCl водой до конечного объема 100 мл.

Компонент В (50 мМ силикат натрия): разбавляли 0,8 мл силиката натрия (Sigma-338443, ~6,25 М Si) водой до конечного объема 100 мл.

Получение коллоидов.

Коллоиды получали в поточной системе, как показано на фиг. 6, с использованием реакционных трубок длиной 30 см. Шприц-насосы А и В работали с расходом 1,05 и 48,5 мл/ч, соответственно, конечный рН составлял 7,55.

#### Получение и применение композиций

Композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению могут быть предназначены для применения в качестве терапевтических агентов, содержащих силикаты. Композиции могут содержать, помимо наночастиц диоксида кремния, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Указанные материалы должны быть нетоксичными и не должны отрицательно влиять на эффективность композиций на основе наночастиц диоксида кремния.

В экспериментах, описанных в настоящем документе, продемонстрировано, что композиции на основе наночастиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению могут непосредственно активировать Т-лимфоциты, что определяют по увеличению экспрессии биомаркеров CD69 и/или CD25, например, по сравнению с необработанным контрольным образцом Т-лимфоцитов. Исследования и способы согласно настоящему изобретению можно применять для скрининга и разработки эффективных терапевтических композиций на основе частиц диоксида кремния и для определения эффективности терапии, проводимой у субъекта или индивидуума.

Активацию Т-лимфоцитов с применением настоящего изобретения можно применять при лечении ряда состояний или нарушений, при которых это может оказывать благоприятное терапевтическое действие у субъекта, как при лечении, так и для профилактики, преимущество заключается в том, что при введении в соответствующей концентрации композиции на основе частиц диоксида кремния, применяемые согласно настоящему изобретению, по существу не оказывают прямого цитотоксического действие на раковые клетки. Раковые заболевания также могут включать, но не ограничиваются ими: меланоме, раковые заболевания кожи, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, прямой кишки и других внутренних органов, рак желудка, рак молочной железы, лимфомы, лейкозы, раковые заболевания матки, рак предстательной железы, рак пищевода, раковые заболевания кости, раковые заболевания мочевого пузыря, рак шейки матки, рак эндометрия, рак мозга, раковые заболевания глаз, рак яичников, рак яичек, рак печени, рак почки, раковые заболевания головы и шеи, и включает метастатические и первичные формы рака.

Тем не менее, несмотря на то, что одним из предпочтительных способов применения настоящего изобретения является лечение рака, способы Т-клеточной терапии, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения других состояний, в частности, при лечении инфекций, таких как бактериальная инфекция или вирусная инфекция. Инфекции включают, но не ограничиваются ими: инфекции, вызванные вирусами, ретровирусами и бактериями, такими как микобактерии, грамположительные бактерии и грамотрицательные бактерии, а также гельминтами, паразитами и другими возбудителями инфекций. Временно стабильные наночастицы силикатов также могут выступать в качестве резервуара для высвобождения кремниевой кислоты, которая как таковая является эффективной для улучшения состояния соединительных тканей и может применяться при остеопорозе, заживлении переломов, заболеваниях суставов, кожных заболеваниях, нарушениях кровеносных сосудов.

Таким образом, введение можно проводить парентеральным способом, в частности, внутривенным способом.

Другие способы применения композиций согласно настоящему изобретению в медицине включают лечение гипертензии, диабета, заболеваний костей, сердечно-сосудистых заболеваний, нейродегенеративных патологий, рака всех типов, не указанных выше, повышенной кислотности, остеопороза, зубного камня, болезни Альцгеймера, болезни Крейтцфельда-Якоба, а также заживление ран. Другие способы применения композиций согласно настоящему изобретению в медицине включают лечение поражений кожи в результате ожога, ран или действия патогенов или едких веществ, включая лечение солнечного ожога, или любых кожных заболеваний, включая псориаз, экзему и других форм дерматита.

Согласно некоторым аспектам способы применения настоящего изобретения с использованием активированных Т-лимфоцитов в медицине предназначены для лечения субъекта-человека. Тем не менее, помимо применения для лечения или предупреждения состояний у субъекта-человека настоящее изобретение можно применять в ветеринарии, например, для лечения животного, отличного от человека, и, в частности, млекопитающих, отличных от человека, таких как собаки, кошки и лошади.

Жидкие фармацевтические композиции в общем случае включают жидкий носитель, такой как вода, смеси углеводов, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Если добавку, содержащую силикат, необходимо сохранять в твердой форме, например, для контроля доставки компонента материала, может потребоваться соответствующий выбор компонентов состава, например, при получении жидкого состава материала. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки, например, в тех вариантах реализации настоящего изобретения, в которых композиции на основе полимерных силикатов подходят для введения субъекту через капельницу.

Для терапевтического применения композиции на основе наночастиц диоксида кремния, применяемые согласно настоящему изобретению, предпочтительно вводят индивидууму в "профилактически эффективном количестве" или "терапевтически эффективном количестве" (в определенных случаях, хотя профилактику можно рассматривать как терапию), которое является достаточным для обеспечения благоприятного действия у индивидуума (например, биодоступности). Фактическое вводимое количество и скорость и продолжительность введения зависят от природы и тяжести состояния, подвергающегося лечению. Назначение лечения, например, выбор дозировки и т.д., входит в рамки ответственности врачей общей практики или других врачей и, как правило, проводится с учетом нарушения, подвергающегося лечению, состояния конкретного пациента, участка, в который проводят доставку, способа введения и других факторов, известных практикующим врачам. Примеры способов и протоколов, указанных выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 20-е издание, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins. Композицию можно вводить отдельно или в комбинации с другими способами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от состояния, подвергающегося лечению.

Материалы и способы.

Получение композиции на основе частиц диоксида кремния HS-7.

HS-7 получали путем разбавления 0,1 г силиката натрия (кат.№ 338443; Sigma-Aldrich Chemical Co., Gillingham, UK) в 20 г дистиллированной деионизированной воды (DDW; 18 МОм/см) и доведения pH до 6,7-7,0 (тест-полоски для определения pH, Sigma-Aldrich Co., кат.№ P3536) хлороводородной кислотой (HCl, 4-5 М). Дисперсии оставляли для установления равновесия на 16-24 ч при комнатной температуре.

Получение композиции на основе частиц диоксида кремния "uSANS".

Дисперсии ультрамелких наночастиц аморфного диоксида кремния (uSANS) (1,9 нм) получали согласно WO 2015/121666. uSANS получали путем разбавления 4 мл силиката натрия (кат.№ 338443; Sigma-Aldrich Chemical Co., Gillingham, UK) в 30 мл дистиллированной деионизированной воды (DDW; 18 МОм/см). Быстро добавляли 2 мл HCl (37%) при перемешивании. Разбавляли раствор до 50 мл H<sub>2</sub>O и инкубировали при комнатной температуре в течение 16-24 ч перед использованием.

Сравнительные композиции на основе диоксида кремния согласно примеру 4 в US 2011/0229577 (Керек).

7,4 мл TMOS смешивали с 25 мл воды UHP. Доводили pH до 3,6 уксусной кислотой (0,5 М) и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при 45°C на масляной бане при перемешивании. Затем оставляли охлаждаться суспензию до комнатной температуры на 40 мин и доводили pH до 2,0 при помощи 1М HCl. Наконец, удаляли метанол на ротонном испарителе (T=40-45°C).

#### Клеточные исследования

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из конических камер с отдельными лейкоцитами, которые приобретали в National Blood Service (Cambridge, UK), путем центрифугирования в градиенте плотности. Клетки замораживали в среде для замораживания (10% ДМСО, 50% ЭБС, 40% RPMI 1640). Размораживали замороженные клетки, промывали в RPMI и оставляли на 2 ч в RPMI, содержащей 10% ЭБС, 0,3 г/л L-глутамин, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,01 мкг/мл ДНКазы. Клетки повторно суспендировали в RPMI + 20% ЭТС до  $2 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли 0,5 мл в пробирки FACS, затем обрабатывали 0,5 мл RPMI +/- 1600 мкМ наночастиц диоксида кремния (что давало  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл, 800 мкМ наночастиц диоксида кремния). Инкубировали клетки в течение 24 ч, промывали ФБР+1% БСА и окрашивали антителами FACS и маркером жизнеспособности (маркеры жизнеспособности CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, 7-AAD). Клетки немедленно анализировали на проточном цитометре Cyap-ADP с использованием программного обеспечения Summit для сбора данных и анализа (Beckman Coulter), получали как минимум 400000 значений для образца.

Активация CD4 и CD8 Т-клеток ультрадисперсными частицами диоксида кремния.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из конических камер с отдельными лейкоцитами, которые приобретали в National Blood Service (Cambridge, UK), путем центрифугирования в градиенте плотности. Клетки замораживали в среде для замораживания (10% ДМСО, 50% ЭБС, 40% RPMI 1640). Размораживали замороженные клетки, промывали в RPMI и оставляли на 2 ч в RPMI, содержащей 10% ЭБС, 0,3 г/л L-глутамин, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,01 мкг/мл ДНКазы. Клетки повторно суспендировали в RPMI + 20% ЭТС до  $2 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли 0,5 мл в пробирки FACS, затем обрабатывали 0,5 мл RPMI  $\pm$  1600 мкМ наночастиц диоксида кремния (что давало  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл, 800 мкМ наночастиц диоксида кремния). Инкубировали клетки в течение 24 ч, промывали ФБР+1% БСА и окрашивали антителами FACS и маркером жизнеспособности (маркеры жизнеспособности CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, 7-AAD). Клетки немедленно анализировали на проточном цитометре Суан-ADP с использованием программного обеспечения Summit для сбора данных и анализа (Beckman Coulter), получали как минимум 400000 значений для образца.

Активация различных клеточных линий Th ультрадисперсными наночастицами диоксида кремния.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из конических камер с отдельными лейкоцитами, который приобретали в National Blood Service (Cambridge, UK), путем центрифугирования в градиенте плотности. Клетки замораживали в среде для замораживания (10% ДМСО, 50% ЭБС, 40% RPMI 1640). Размораживали замороженные клетки, промывали в RPMI и оставляли на 2 ч в RPMI, содержащей 10% ЭБС, 0,3 г/л L-глутамин, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,01 мкг/мл ДНКазы. Клетки повторно суспендировали в RPMI + 20% ЭТС до  $2 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли 0,5 мл в пробирки FACS, затем обрабатывали 0,5 мл RPMI  $\pm$  17 мкл или 35 мкл наночастиц диоксида кремния (что давало  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл, 400 и 800 мкМ наночастиц диоксида кремния, соответственно). Инкубировали клетки в течение 24 ч, промывали ФБР+1% БСА и окрашивали антителами FACS и маркером жизнеспособности (маркеры жизнеспособности CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CD40L, LAP, GARP, 7-AAD). Для внутриклеточного окрашивания FoxP3 клеточные мембраны обрабатывали буфером для увеличения проницаемости клеточных мембран перед внутриклеточным окрашиванием. Клетки немедленно анализировали на проточном цитометре Суан-ADP с использованием программного обеспечения Summit для сбора данных и анализа (Beckman Coulter), получали как минимум 400000 значений для образца. Для анализа цитокина IFN-гамма надосадочные жидкости, собранные по завершении инкубации, анализировали на наличие IFN-гамма с использованием стандартных наборов ELISA согласно инструкциям производителя.

#### Токсичность трех различных форм наночастиц диоксида кремния в отношении клеток венозного эндотелия

Восстанавливали жизнеспособность клеток венозного эндотелия пупочного канатика человека (HUVEC; ATCC, Manassas, USA) после хранения в криокамере в жидком азоте и выдерживали в полной питательной среде: среда F-12K (ATCC), дополненная 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS "Gold"; PAA Laboratories, UK), 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Invitrogen Ltd, Life Technologies, UK), 0,1 мг/мл гепарина (Sigma Aldrich Chemical Co., UK) и 0,05 мг/мл добавок для роста клеток эндотелия (Alfa Aesar, UK). Клетки выращивали в колбах для клеточных культур Nunc T75 (75 см<sup>2</sup>; VWR International, UK) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Для проведения экспериментов клетки удаляли из колб при 70% конфлюэнтности с использованием раствора 0,1% трипсина/0,02% ЭДТА и высевали в 48-луночные планшеты с использованием 1 мл полной питательной среды на лунку. Клетки выращивали до образования конфлюэнтного монослоя.

Обработка наночастицами диоксида кремния. Исследовали три препарата наночастиц диоксида кремния. Они обозначены как HS7, uSANS in situ и uSANS с сахарозой, что, соответственно, относится к наночастицам диоксида кремния, полученным следующим образом.

Сах.uSANS: частицы uSANS возрастом 1 день получали путем быстрого подкисления 500 мМ Si(OH)<sub>4</sub> + 1,5 М сахарозы до pH 0,8-1 и немедленного разбавления до 40 мМ смесью H<sub>2</sub>O+глюкоза (конечная концентрация глюкозы 136 мМ). Дисперсию инкубировали в течение ночи и нейтрализовали до pH 7 непосредственно перед применением.

uSANS in situ: (pH 5,0; периодический синтез; цитратный буфер) получали путем смешения 1 мл 80 мМ Si(OH)<sub>4</sub> и 1 мл цитрата (8 мМ, + 47 мМ HCl). Раствор инкубировали в течение 30 мин и добавляли 0,17 мл 10 $\times$  солевого раствора перед применением.

Препараты добавляли в клетки в полной питательной среде при конечной общей концентрации кремния 1, 2, и 4 мМ Si. Результаты указанной обработки сравнивали с необработанными клетками и клетками, обработанными носителем, - исследовали три носителя (один для каждого препарата наночастиц диоксида кремния) в дозе, эквивалентной обработке 4 мМ наночастицами диоксида кремния. Каждую обработку и контроль проводили в шести повторностях (т.е. n=6). Вкратце, удаляли среду из шести лунок, разбавляли наночастицы диоксида кремния в полной питательной среде и немедленно добавляли в лунки (0,5 мл на лунку).

После завершения добавления наночастиц диоксида кремния или носителя в клетки 48-луночные планшеты помещали в систему визуализации живых клеток IncuCyte Zoom (Essen BioScience Inc., USA) и

получали фазово-контрастные изображения каждые 2 ч в течение 68 ч.

Индукция pZap70 в Т-клетках под действием наночастиц диоксида кремния

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из конических камер с отдельными лейкоцитами, которые приобретали в National Blood Service (Cambridge, UK), путем центрифугирования в градиенте плотности. Клетки замораживали в среде для замораживания (10% ДМСО, 50% ЭБС, 40% RPMI 1640). Размораживали замороженные клетки, промывали в RPMI и оставляли на 2 ч в RPMI, содержащей 10% ЭБС, 0,3 г/л L-глутамин, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,01 мкг/мл ДНКазы. Т-клетки обогащали с использованием свежего универсального набора для выделения Т-клеток. Клетки повторно суспендировали в RPMI + 20% ЭТС до  $2 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли 0,5 мл в пробирки FACS, затем обрабатывали 0,5 мл RPMI  $\pm$  1600 мкМ наночастиц диоксида кремния (что давало  $1,0 \times 10^6$  клеток/мл, 800 мкМ наночастиц диоксида кремния). Инкубировали клетки в течение 0-6 ч, осаждали и проводили лизис с использованием буфера для образца NuPage LDS. Проводили вестерн-блот анализ лизатов, проводя окрашивание на винкулин (внутренний контроль, (An et al., 2012; Solan et al., 2003)) и pZap70 (Tyr319). Интенсивности полос количественно оценивали путем интегрирования и указывали в процентах от значения для полосы внутреннего контроля.

После активации комплекса TCR/CD3 комплексом pMHC, суперантигеном или митогенным антигеном инициируется активация Т-клеток за счет фосфорилирования дзета-цепь-ассоциированной протеинкиназы 70 (Zap70), расположенной в фосфорилированных иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивах (ITAM) (Love and Hayes, 2010). Фосфорилированный Zap70 (pZap70) затем фосфорилирует последующие белки каскада, что приводит к передаче сигнала через ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) и ответу активированных Т-клеток (Chakraborty and Weiss, 2014; Fathman and Lineberry, 2007; Rossy et al., 2012; Wang et al., 2010).

Молибдатное исследование растворения

Молибдатное исследование растворения включает использование образца композиции полимерного силиката и разбавление его в буфере. Исследование с использованием молибденовой кислоты можно применять для определения зависимости концентрации растворимых силикатов, содержащихся в аликвоте буфера, от времени в ходе исследования. Как показано в примерах, композицию можно разбавлять в 50 мМ буфере HEPES при pH 7,0-7,4. В типовом исследовании с использованием молибденовой кислоты применяют 100 мкл исследуемого раствора или стандарта (полученного из стандарта Si ICP 30, Sigma Aldrich, 1000 мг/л) и 200 мкл окрашивающего раствора молибденовой кислоты (34,5 мМ Мо (который добавляют в виде  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) и 0,15 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Анализируемый раствор переносят в планшет с лунками и перемешивают в течение 10 мин. После инкубации можно измерять поглощение (400 нм) и определять концентрацию растворимой кремниевой кислоты по стандартной кривой.

Молибдатное исследование лабильности 7,5 мкл 40 мМ суспензий Si переносили в 96-луночный планшет и очень быстро добавляли 100 мкл воды UHP, затем 200 мкл раствора молибденовой кислоты (34,5 мМ  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  в 0,15 мМ  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Измеряли поглощение при 400 нм каждые 60 с в течение 17 ч. В указанном исследовании в качестве контроля использовали 40 мМ раствор кремниевой кислоты.

Исследование растворения

Цельную кровь собирали в пробирки с гепарином и слегка перемешивали. Добавляли дополнительное количество гепарина (до концентрации 0,5 мг/мл) для предотвращения коагуляции, наночастиц диоксида кремния и последовательно разбавляли согласно следующей схеме, 16 мМ в течение 25 с, 4 мМ в течение 1 ч, 2 мМ в течение 3 ч и 1 мМ в течение 20 ч. После обработки и инкубации проводили лизис красных кровяных телец, окрашивали и немедленно проводили FACS. В качестве положительного контроля в цельную кровь добавляли SEB в концентрации 2 мкг/мл. В указанном исследовании было показано, что uSANS in situ (в цитратном буфере, периодический синтез) имели такой же профиль стимуляции, что и стандартные uSANS, при определении по выборкам CD4 (+)-CD25, CD4 (+)-CD69, CD8 (+)-CD25 и CD8 (+)-CD69.

Результаты

В экспериментах, описанных выше, продемонстрировано, что только ультрадисперсные наночастицы диоксида кремния индуцируют долгосрочную активацию Т-лимфоцитов (ни растворимая кремниевая кислота ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ), ни более крупные частицы диоксида кремния (например, >10 нм) не дают такого результата). На фиг. 1 и 2 показана экспрессия маркера активации CD69 в хелперных Т-клетках после обработки кремниевой кислотой и ультрадисперсными наночастицами диоксида кремния в течение 24 ч по сравнению с контролем на исходном уровне без стимуляции и силикатами, полученными согласно US 2011/0229577 (Керек, фиг. 1), и коммерчески доступной композицией ортокремниевой кислоты, стабилизированной холином, Biosil™ (фиг. 2). На фиг. 3-6 показаны результаты схожих сравнений, дополнительно включавших использование суперантигена Т-лимфоцитов SEB (стафилококковый энтеротоксин В) в качестве положительного контроля. Как было показано, композиции на основе частиц диоксида кремния согласно настоящему изобретению индуцируют активацию Т-клеток за счет повышения экспрессии маркеров активации CD25 и CD69. И снова, кремниевая кислота не влияла на экспрессию маркеров активации Т-клеток (данные не показаны). Ультрадисперсные наночастицы диоксида кремния со-



гласно настоящему изобретению также индуцировали долгосрочную активацию Т-клеток по сравнению с суперантигеном SEB. На фигурах показано, что наночастицы диоксида кремния активируют Т-хелперы (CD4+) и цитотоксические (CD8+) Т-клетки (т.е. они приобретают положительный статус CD25 и CD69 после воздействия наночастиц силикатов).

В экспериментах, описанных в настоящем документе, показано, что Т-клетки из многих клеточных линий могут быть восприимчивы к активации Т-клеток под действием указанных ультрадисперсных наночастиц диоксида кремния (фиг. 8).

Тем не менее, несмотря на лучшую переносимость по сравнению с частицами HS7, частицы uSANS все равно имеют умеренную токсичность в отношении клеток эндотелия (фиг. 9). Тем не менее, uSANS с минимальной токсичностью могут быть получены в рамках синтеза *in situ*. Он может представлять собой периодический синтез в квазинейтральных буферных системах или, в качестве альтернативы, поточный синтез. Указанные результаты могут быть воспроизведены при использовании uSANS, полученных способом синтеза *in situ*, как описано в настоящем документе.

Список литературы.

Содержание всех документов, указанных в настоящем описании, включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылок.

Jugdaohsingh et al., Is there a biochemical role for silicon? в *Metal Ions in Biology and Medicine*, 10 том, стр. 45-55, 2008, John Libbey Eurotext: Montrouge.

WO 2009/052090.

Опубликованная заявка на патент США: 2009/0130230.

Опубликованная заявка на патент США: 2013/0149396.

Патент США №5807951 (Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.).

WO 95/21124.

Европейский патент EP 1371289A.

Опубликованная заявка на патент США: 2011/0229577 (Керек).

Kim et al. (*Macromolecules*, 45: 4225-4237, 2012).

Gao et al. (*Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 350: 33-37, 2009).

Jaganathan H, Godin B. *Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles*. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 May 22.

Kerek, F. Biologically active silicic acid. Европейский патент EP 2151466 A1, 1 августа 2008 года.

Ueki A, Yamaguchi M, Ueki H, et al. *Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro*. *Immunology*. 1994; 82:332-5.

Lee S, Hayashi H, Maeda M, Chen Y, Matsuzaki H, Takei-Kumagai N, Nishimura Y, Fujimoti W, Otsuki T. *Environmental factors producing autoimmune dysregulation--chronic activation of T cells caused by silica exposure*. *Immunobiology* 217 (2012) 743-748

Kusaka, Yasumitsu Nichimura and Takemi Otsuki (2014). *Immunostimulation by Silica Particles and the Development of Autoimmune Dysregulation, Immune Response Activation*, Dr. Ht Duc (ред.), InTech, DOI: 10.5772/57544.

Hayashi H, Miura Y, Maeda M, Murakami S, Kumagai N, Nishimura Y, Kusaka M, Urakami K, Fujimoto W, Otsuki T. *Reductive alteration of the regulatory function of the CD4(+)/CD25(+) T*

*cell fraction in silicosis patients*. International Journal of Immuno-pathology and Pharmacology 2010; 23(4) 1099-109.

Bastos, C.A.P; Faria, N.J.R.; Powell, J.J.; Vis, B.M. Material and methods relating to stabilized polymeric silicate compositions. WO2015121666, Aug 20, 2015.

Bruggraber, S.F.A.; Faria, N.J.R.; Pereira, D.I.A.; Powell, J.J. Ligand modified poly oxo-hydroxy metal ion material, their uses and processes for their preparation. Европейский патент EP 2125847 B1, 6 февраля 2008 года.

An, X., Y. Jin, M.J. Philbrick, J. Wu, A. Messmer-Blust, X. Song, B.L. Cully, P. He, M. Xu, and H.S. Duffy. 2012. Endothelial Cells Require Related Transcription Enhancer Factor-1 for Cell-Cell Connections Through the Induction of Gap Junction Proteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 32:1951-1959.

Chakraborty. A.K., and A. Weiss. 2014. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nature Immunology*. 15:798-807.

Fathman, C.G., and N.B. Lineberry. 2007. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nature Reviews Immunology*. 7:599-609.

Love, P.E., and S.M. Hayes. 2010. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a002485.

Rossy, J., D.J. Williamson, and K. Gaus. 2012. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Frontiers in immunology*. 3:167.

Solan, J.L., M.D. Fry, E.M. TenBroek, and P.D. Lampe. 2003. Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *Journal of Cell Science*. 116:2203-2211.

Wang, H., T.A. Kadlecck, B.B. Au-Yeung, H.E.S. Coodfellow, L.-Y. Hsu, T.S. Freedman, and A. Weiss. 2010. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a002279.

Becker JC, Schrama D. The dark side of cyclophosphamide: cyclophosphamide-mediated ablation of regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2013 Jun;133(6):1462-5.

Crotty, S. 2015. A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology*. 15:185-189.

Elgueta, R., M.J. Benson, V.C. De Vries. A. Wasiuk, Y. Guo, and R.J. Noelle. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews*. 229:152-172.

Gauthy, E., J. Cuende, J. Stockis, C. Huygens, B. Lethé, J.-F. Collet, G. Bommer, P.G. Coulie, and S. Lucas. 2013. GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF- $\beta$ 1 production by human regulatory T cells. *PLoS one*. 8:e76186.

Geginat, J., M. Paroni, S. Magile, J.S. Alfen, I. Kastirr, P. Gruarin, M. De Simone, M. Pagani, and S. Abrignani. 2015. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *CD4+ T cell differentiation in infection: amendments to the Th1/Th2 axiom*:67.

Jugdaohsingh R, Reffitt DM, Oldham C, Day JP, Fifield LK, Thompson RPH, Powell JJ. 2000. Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71:944-949.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C.M. Costantino, and D.A. Hafler. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. 10:490-500.

Sripanyakorn S et al., The comparative absorption of silicon from different foods and food Supplements. *British Journal of Nutrition* (2009), 102, 825-834.

Stockis, J., D. Colau, P.G. Coulie, and S. Lucas. 2009. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- $\beta$  on the surface of activated human Treg. *European journal of immunology*. 39:3315-3322.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей частицы диоксида кремния, имеющие средний диаметр от 0,5 до 10 нм, в способе активации Т-лимфоцитов при Т-клеточной терапии субъекта/индивидуума, где активация Т-лимфоцитов характеризуется увеличением экспрессии CD69 и/или CD25 в Т-лимфоцитах.

2. Применение композиции по п.1, где указанная Т-клеточная терапия представляет собой лечение рака.

3. Применение композиции по п.1, где указанная Т-клеточная терапия представляет собой Т-клеточную терапию не для лечения рака.

4. Применение композиции п.1, где указанная Т-клеточная терапия представляет собой лечение инфекции или лечение воспалительного заболевания.

5. Применение композиции по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанное увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 составляет по меньшей мере 20% по сравнению с контролем на исходном уровне без стимуляции.

6. Применение композиции по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанные Т-лимфоциты представляют собой Т-клетки, необязательно указанные Т-клетки представляют собой Т-хелперные клетки, регуляторные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, естественные Т-киллеры (НКТ) или гамма-дельта Т-клетки.

7. Применение композиции по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанная активация лимфоцитов включает индуцирование воспалительного ответа по типу Th1.

8. Применение композиции по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что:

(а) указанная активация лимфоцитов включает увеличение экспрессии одного или более дополнительных маркеров, выбранных из CD40L, LAP/GARP и/или FoxP3; и/или

(б) указанная активация лимфоцитарных клеток включает увеличение экспрессии IFN- $\gamma$ .

9. Применение композиции по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что указанная композиция по существу не индуцирует пролиферацию лимфоцитарных клеток.

10. Применение композиции по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что указанные частицы диоксида кремния имеют средний диаметр от 0,5 до 10 см, где, необязательно, указанные частицы диоксида кремния имеют средний диаметр от 2 до 5 нм.

11. Применение композиции по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что:

(а) указанная композиция содержит стабилизаторы, необязательно выбранные из полиолов, сахаров и/или четвертичных аммониевых солей, таких как холин и карнитин; или

(б) указанная композиция не содержит стабилизатор.

12. Применение композиции по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что указанная композиция на основе диоксида кремния может быть получена путем осаждения.

13. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанная композиция на основе частиц диоксида кремния по существу не оказывает прямое цитотоксическое действие на раковые клетки.

14. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанное воспалительное заболевание представляет собой рассеянный склероз, ревматоидный артрит, болезнь Крона, астму или язвенный колит.

15. Применение композиции по любому из пп.1-14, отличающееся тем, что указанный способ включает введение субъекту агента, который может подавлять или усиливать одну или более специфических клеточных линий или фенотипов Т-клеток; где необязательно указанный агент представляет собой циклофосфамид.

16. Применение композиции по любому из пп.1-15, отличающееся тем, что указанный способ включает получение композиции на основе частиц диоксида кремния путем синтеза *in situ* перед введением субъекту.

17. Применение композиции по п.16, отличающееся тем, что:

(a) указанный синтез *in situ* включает смешение (i) раствора силиката с  $pH > 10,5$  и (ii) кислого буферного раствора для получения композиции коллоидного диоксида кремния, имеющей  $pH$  от 4,0 до 8,5; или

(b) указанный синтез *in situ* включает смешение (i) раствора силиката с  $pH > 10,5$  и (ii) кислого буферного раствора для получения композиции коллоидного диоксида кремния, имеющей  $pH$  от 4,0 до 6,5, в рамках периодического способа синтеза *in situ*; или

(c) указанный синтез *in situ* включает смешение (i) раствора силиката с  $pH > 10,5$  и (ii) кислого буферного раствора для получения композиции коллоидного диоксида кремния, имеющей  $pH$  от 6,5 до 8,5, в рамках поточного способа синтеза *in situ*.

18. Применение композиции по любому из пп.1-17, отличающееся тем, что указанная композиция коллоидного диоксида кремния предназначена для введения субъекту, где необязательно указанный способ включает введение композиции коллоидного диоксида кремния субъекту менее чем через 12 мин после смешения растворов.

19. Применение композиции по любому из пп.1-18, отличающееся тем, что указанная композиция предназначена для внутривенного введения.

20. Применение композиции по п.17, отличающееся тем, что указанный кислый раствор содержит хлороводородную кислоту, карбоновую кислоту, такую как лимонная кислота, или кислую аминокислоту, такую как глицин.

21. Применение композиции по любому из пп.1-20, отличающееся тем, что указанный способ представляет собой способ Т-клеточной терапии, включающий получение образца, содержащего Т-клетки, у субъекта, приведение образца Т-клеток в контакт с композицией диоксида кремния для активации Т-клеток в образце и введение активированных Т-клеток субъекту.

22. Применение композиции по любому из пп.1-21, отличающееся тем, что указанные активированные Т-лимфоциты предназначены для применения в лечении субъекта-человека.

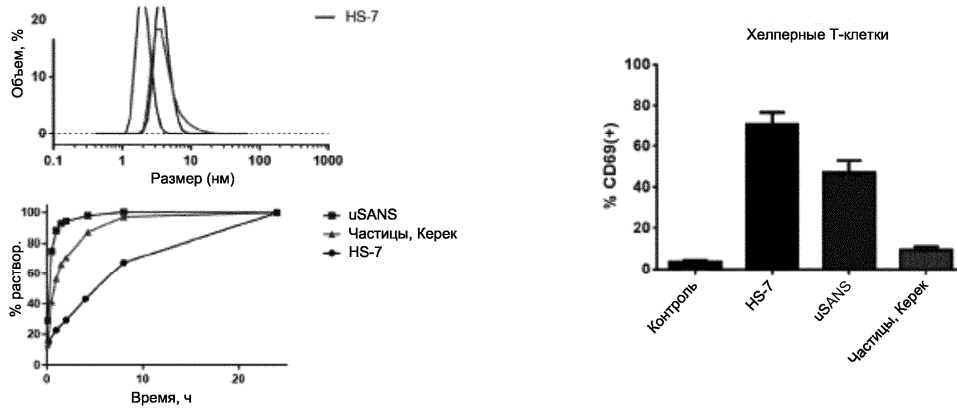
23. Применение композиции по любому из пп.1-21, отличающееся тем, что указанные активированные Т-лимфоциты предназначены для применения в лечении животного, отличного от человека, где необязательно указанные активированные Т-лимфоциты предназначены для применения в ветеринарии, где необязательно указанные активированные Т-лимфоциты предназначены для применения в лечении собак, кошек или лошадей.

24. Способ определения эффективности композиции на основе частиц диоксида кремния при терапевтическом введении субъекту или индивидууму, включающий:

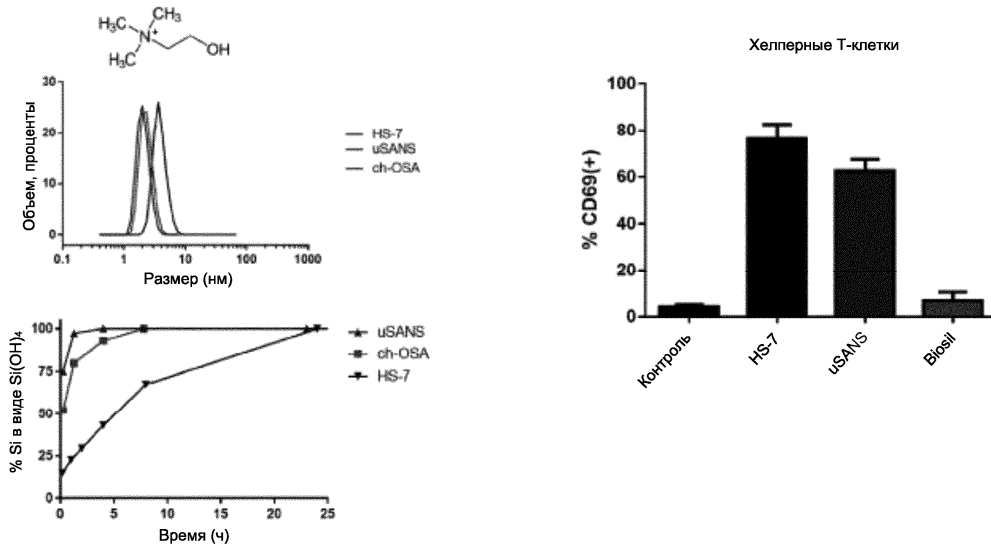
(a) приведение образца Т-лимфоцитов в контакт с композицией на основе частиц диоксида кремния, имеющих средний диаметр от 0,5 до 10 нм;

(b) определение экспрессии CD69 и/или CD25 в Т-лимфоцитах, присутствующих в образце; и

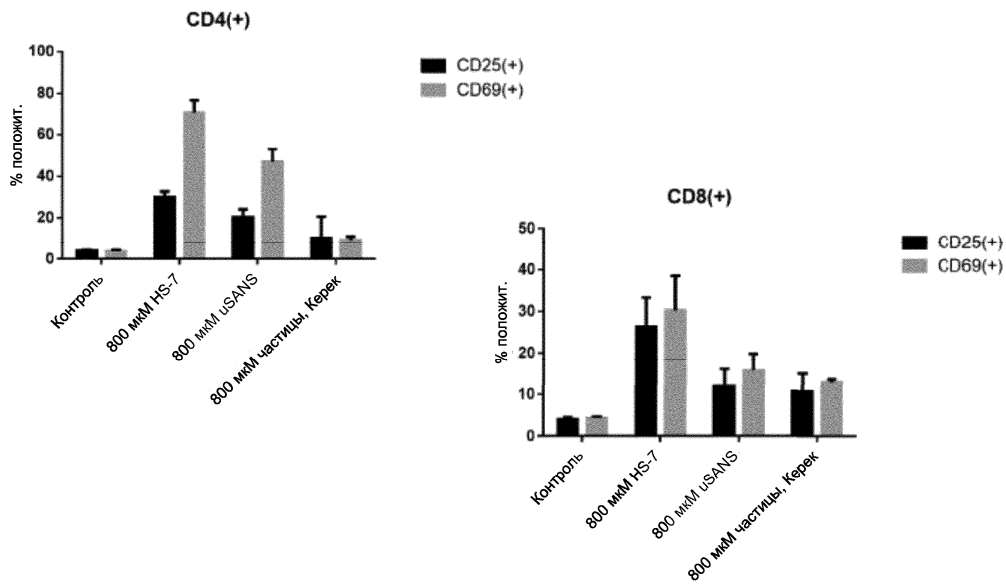
(c) отнесение композиций на основе частиц диоксида кремния, которые вызывают увеличение экспрессии CD69 и/или CD25 в Т-лимфоцитах, к подходящим для применения в Т-клеточной терапии.



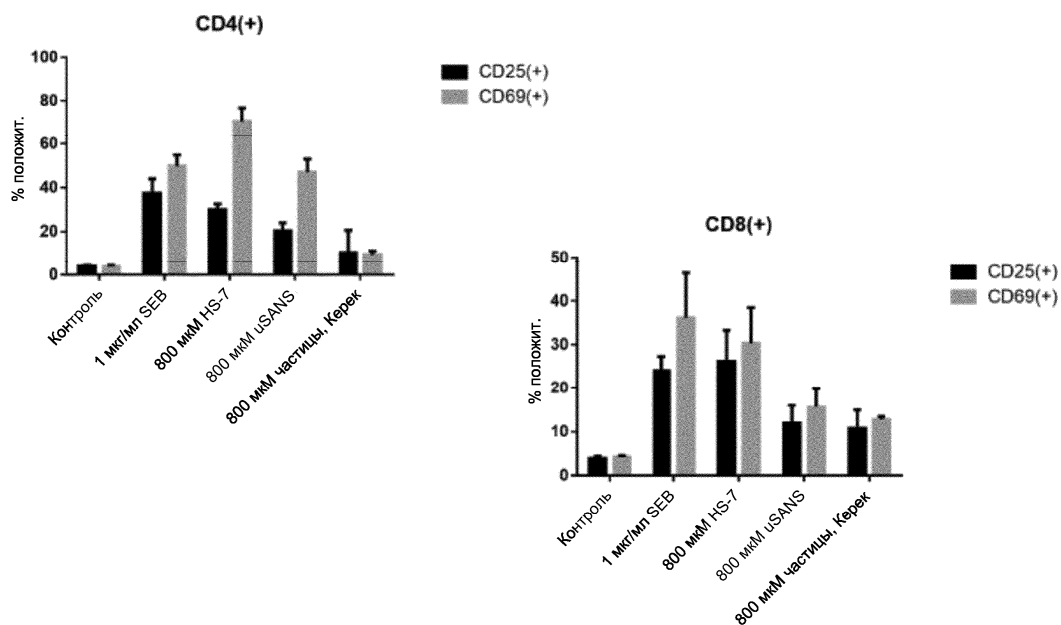
Фиг. 1



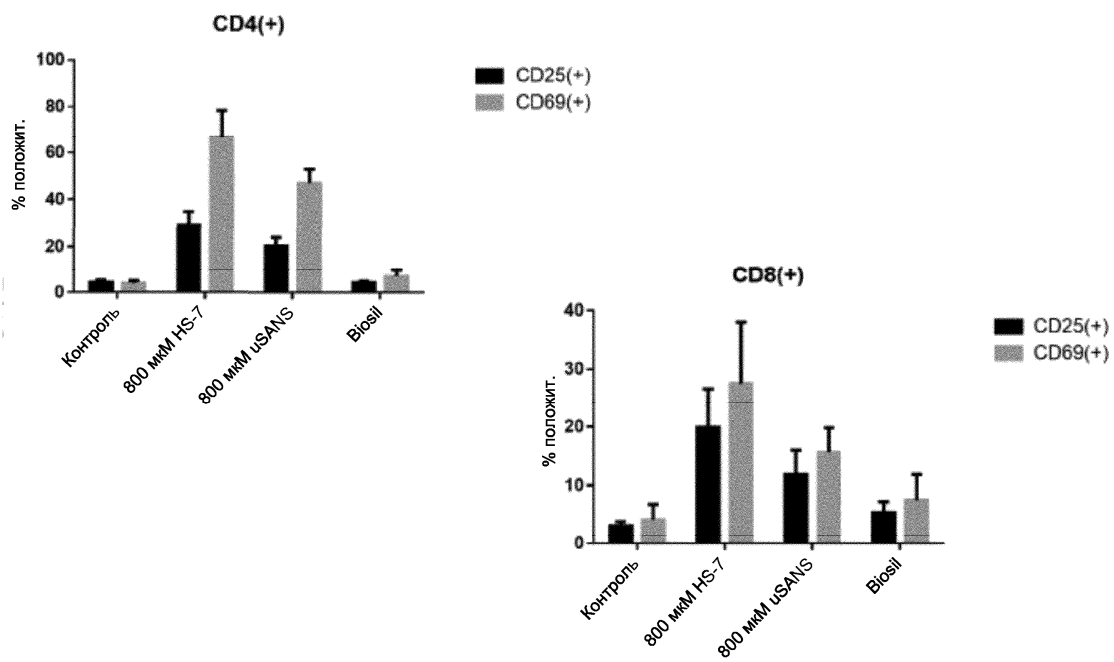
Фиг. 2



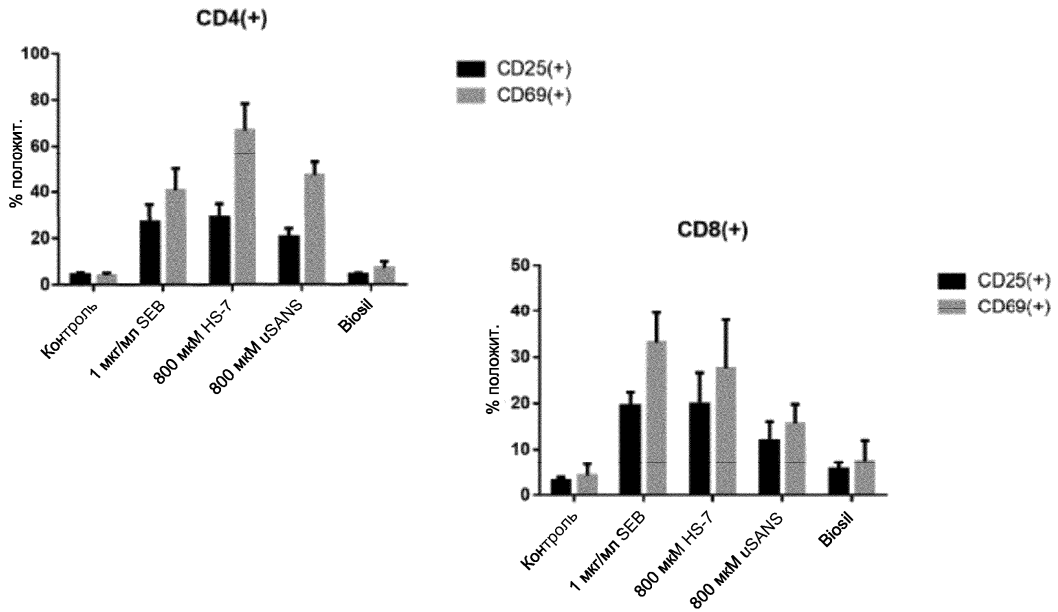
Фиг. 3



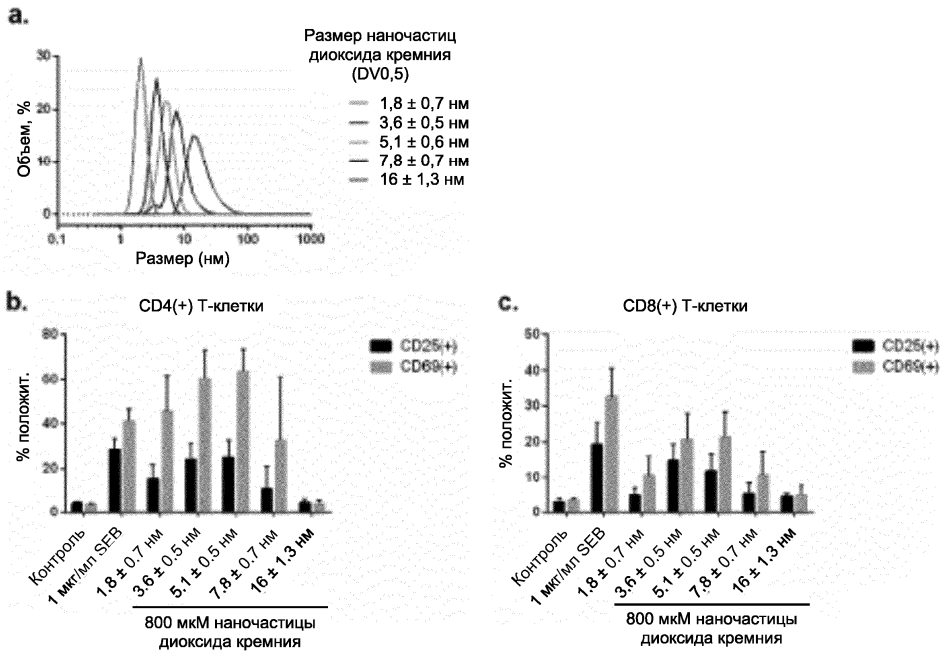
Фиг. 4



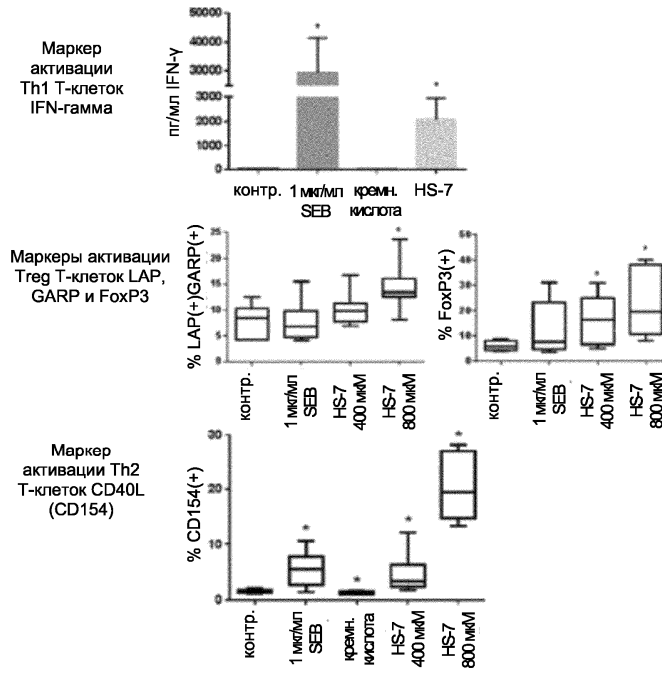
Фиг. 5



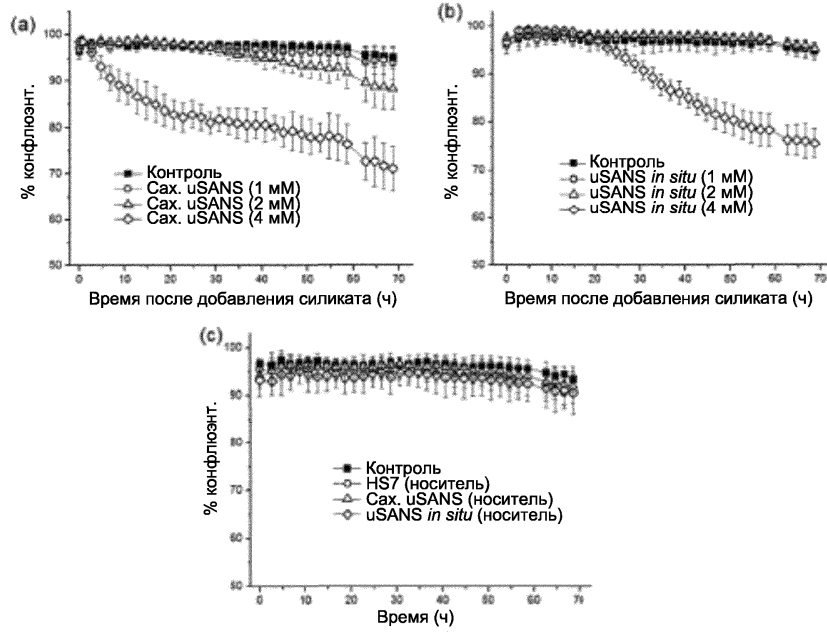
Фиг. 6



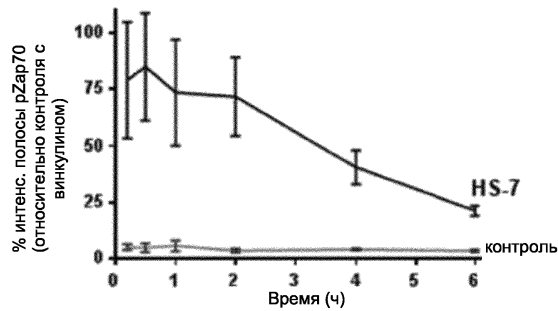
Фиг. 7



Фиг. 8

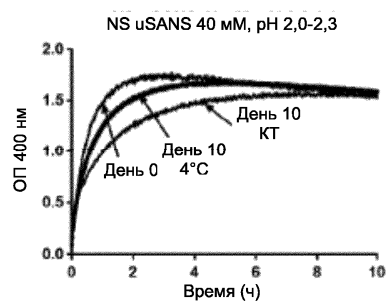
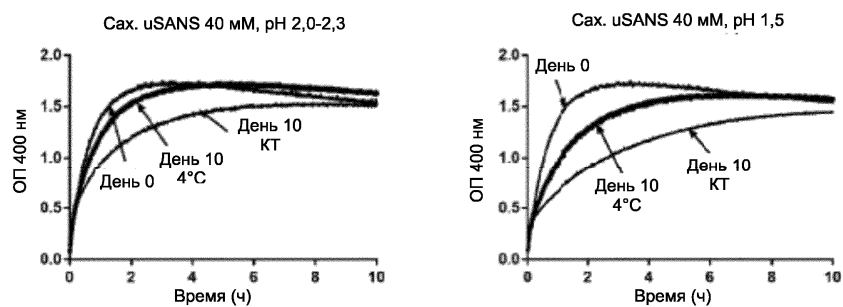


Фиг. 9

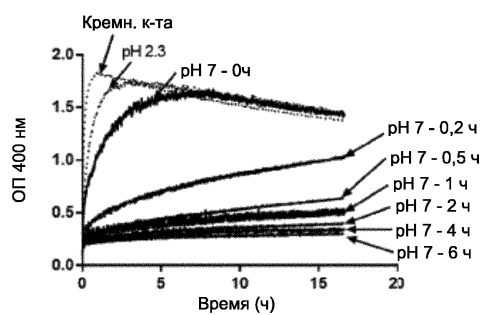


Фиг. 10

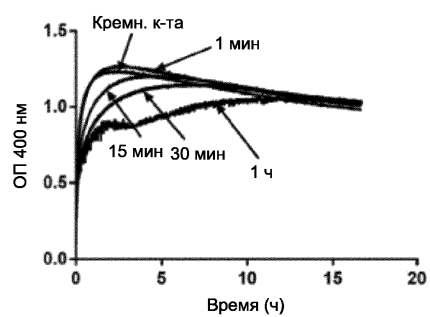




Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13