

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041309**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.06

(51) Int. Cl. **A61K 39/085 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201691348

(22) Дата подачи заявки
2014.12.29

(54) **ТЕРМОСТАБИЛЬНАЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА (ВАРИАНТЫ), СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ, ФЛАКОН, СОДЕРЖАЩИЙ КОМПОЗИЦИЮ, СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА**

(31) **61/922,761**

(56) **WO-A2-2012085872**

(32) **2013.12.31**

WO-A1-2013006837

(33) **US**

WO-A2-2013177444

(43) **2016.11.30**

(86) **PCT/US2014/072615**

(87) **WO 2015/103167 2015.07.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНФЕКШЕС ДИЗИЗ РИСЕРЧ
ИНСТИТЬЮТ (US)**

(72) Изобретатель:
**Фокс Кристофер Б., Вендвик Томас С.,
Барнс В. Люсьен, Крамер Райен М.,
Рид Стивен Г. (US)**

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

(57) Изобретение относится к термостабильным лиофилизированным композициям для стимуляции иммунного ответа, к способам их получения и хранения, а также к флакону, содержащему такую композицию, и к способу стимуляции иммунного ответа у индивидуума. Лيوфилизированные композиции главным образом содержат антиген и/или адъювант, метаболизируемое масло и формирующий лепешку эксципиент.

B1

041309

041309

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к области фармацевтических и вакцинных составов.

Перекрестная ссылка на родственные патентные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки США с серийным номером № 61/922761, поданной 31 декабря 2013 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Уровень техники

Рационально сконструированные вакцинные адъюванты нового поколения являются значительным прорывом в разработке вакцин против серьезных заболеваний, включая туберкулез, ВИЧ и малярию. Однако эти новые адъюванты также требуют поддержания условий холодовой цепи для обеспечения длительной стабильности. Это является существенным финансовым и технологическим барьером для внедрения таких вакцин по всему миру. Кроме того, поддержание условий холодовой цепи не может быть обеспечено при природных катастрофах, когда подача энергии может быть нарушена. Лиофилизация белок фармацевтических средств, таких как вакцины, является широко используемым способом продления срока хранения и увеличения устойчивости к термической нагрузке (Kasper et al., 2013, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2013 Oct; 85(2):162-9; Wang et al., Int. J. Pharm., 203:1-60), и множество выпускаемых в продажу вакцин распространяются в качестве лиофилизированных продуктов (PATH, и Working in Tandem Ltd, 2012, Summary of stability data for licensed vaccines, Seattle, WA). Новые находящиеся на стадии разработки вакцины против комплексных опосредуемых клеточным иммунитетом заболеваний, таких как малярия и туберкулез, могут потребовать адъювантных компонентов для эффективного усиления и индукции иммунных ответов (Reed et al., 2009, Trends Immunol., 30:23-32). Однако добавление адъюванта(ов) к вакцинному антигену приводит к более сложному составу с потенциалом к множественным взаимодействиям среди компонентов. Таким образом, поддержание длительной стабильности в адъювантных вакцинах может являться значительной проблемой для разработчиков вакцин. По этой причине некоторые адъювантные вакцины вводят после смешения с адъювантом, находящемся в отдельном флаконе для, непосредственно перед применением (US Food and Drug Administration, 2012, Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting). Более того, ни одна из существующих выпускаемых в продажу лиофилизированных вакцин не содержит адъювант в лиофилизированном составе (PATH, and Working in Tandem Ltd, 2012, Summary of stability data for licensed vaccines, Seattle, WA). Действительно лиофилизация адъювантных составов, уже используемых в одобренных вакцинах для человека, такие как соли алюминия и эмульсии типа "масло в воде", может быть особенно трудной (Clausi et al., 2008, J. Pharm. Sci., 97:2049-2061; Rossi et al., 2007, Role of Lipid Excipients in Modifying Oral and Parenteral Drug Delivery: Basic Principles and Biological Examples, p. 88-123, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken NJ). Хотя лиофилизация вакцин, содержащих белок, живой ослабленный или инактивированный вирус или бактерии, является стандартной практикой, на сегодняшний день отсутствуют сообщения об успешной лиофилизации и охарактеризации термостабильности клинической вакцины-кандидата с адъювантом (PATH, and Working in Tandem Ltd, 2012, Summary of stability data for licensed vaccines, Seattle, WA). Описана лиофилизация защитного антигена сибирской язвы в эмульсии сквалена; однако описание термостабильности и биофизическая охарактеризация восстановленной системы не были включены в описание (Ivins et al., 1995, Vaccine, 13:1779-1784). Комплексная природа клинических одобренных вакцинных адъювантов (например, квасцы, эмульсии типа "масло в воде" и/или монофосфориллипид А (MPLA)) является существенным препятствием для развития лиофилизированных адъювантных вакцин.

Разработка адъювантных вакцин, которым не требуется поддержание условий холодовой цепи, обеспечила бы значительное снижение стоимости и технологических препятствий при внедрении новых вакцин по всему миру особенно в условиях низких ресурсов. Таким образом, существует потребность в термостабильных адъювантных вакцинах, которые являются химически стабильными при длительном повышении температуры и которые сохраняют способность индуцировать иммунный ответ против вакцинного антигена. Как описано в настоящем описании, настоящее изобретение удовлетворяет этим потребностям и обеспечивает другие сходные преимущества.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме для всех целей.

Краткое описание сущности изобретения

В одном аспекте изобретение относится к термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, содержащей метаболизируемое масло и формирующий лепешку эксципиент, где композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении и где формирующий лепешку эксципиент представляет собой (1) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы; или (2) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит антиген и/или адъювант.

В одном аспекте изобретение относится к термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, содержащей эффективное количество антигена, метаболизируемое масло и формирующий лепеш-

ку эксципиент, где композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении и где формирующий лепешку эксципиент представляет собой (1) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы; или (2) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит адьювант.

В другом аспекте изобретение относится к термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, содержащей эффективное количество адьюванта, метаболизируемое масло и формирующий лепешку эксципиент, где композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении и где формирующий лепешку эксципиент представляет собой (1) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы; или (2) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы. В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит антиген.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид, выбранный из группы, состоящей из лактозы, рафинозы и лактулозы.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композицию получают путем лиофилизации состава эмульсии типа "масло в воде" и состав эмульсии типа "масло в воде" содержит менее чем или приблизительно 1% (мас./об.) глицерина.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, состав эмульсии типа "масло в воде" содержит менее чем или приблизительно 0,5% (мас./об.) глицерина.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, состав эмульсии типа "масло в воде" не содержит глицерина.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композицию получают лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу, которая имеет концентрацию приблизительно 10% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композицию получают лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу, которая присутствует в концентрации приблизительно 5% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композицию получают лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде", где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы, где маннит в составе эмульсии типа "масло в воде" присутствует в концентрации приблизительно 0,1% (мас./об.) и трегалоза в составе эмульсии типа "масло в воде" присутствует в концентрации приблизительно 5% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композицию получают лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде", где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы и где маннит в составе эмульсии типа "масло в воде" присутствует в концентрации приблизительно 2,5% (мас./об.) и трегалоза в составе эмульсии типа "масло в воде" присутствует в концентрации приблизительно 2,5% (мас./об.).

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, состав эмульсии типа "масло в воде" не содержит глицерина.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 6 месяцев.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 12 месяцев.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 суток.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 недели.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 суток.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 недели.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 суток.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 недели.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 30°C до приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 суток, по меньшей мере 1 недели или по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция имеет форму лепешки привлекательного вида.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композиция имеет форму лепешки, которая не проявляет покоричневения при визуальном исследовании, когда ее хранят в любых условиях температур и длительности, описанных в настоящем описании.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, термостабильность композиции определяют перед восстановлением лиофилизированной композиции.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, форму лепешки и термостабильность определяют путем исследования лепешки в отношении сморщивания, растрескивания и/или покоричневения.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют после восстановления лиофилизированной композиции.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют путем исследования эмульсии типа "масло в воде", образовавшейся при восстановлении, в отношении расслоения.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, композицию получают путем лиофилизации состава эмульсии типа "масло в воде" и концентрация антигена или адъюванта в эмульсии типа "масло в воде", полученной при восстановлении, проявляет деградацию не более чем или приблизительно 25% относительно концентрации антигена или адъюванта в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

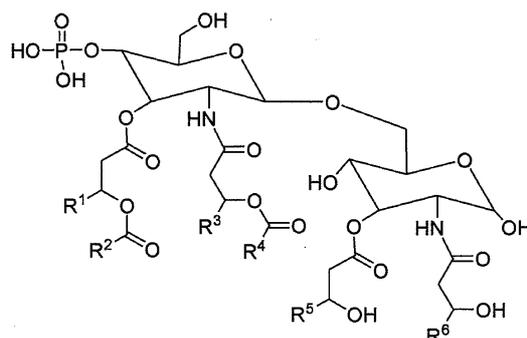
В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют посредством анализа компонентов эмульсии типа "масло в воде", образовавшейся при восстановлении.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, восстановленная эмульсия имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, антиген представляет собой полипептид, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, или патоген.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, адъювант представляет собой метаболизируемое масло. В некоторых вариантах осуществления, метаболизируемое масло представляет собой сквален, синтетический сквален, масло из семян винограда, оливковое масло или синтетический изопреноид.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, адъювант представляет собой агонист TLR4. В некоторых вариантах осуществления, агонист TLR4 представляет собой MPL, 3d-MPL или синтетический GLA. В некоторых вариантах осуществления синтетический адъювант GLA имеет следующую структуру:



где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и

R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил.

В некоторых вариантах осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и

R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

В некоторых вариантах композиций, описанных в настоящем описании, метаболизируемое масло представляет собой сквален, минеральное масло, масло из семян винограда, синтетический сквален или синтетический изопреноид.

В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин-3-фосфохолин (POPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), яичный PC, лецитин, твин или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем описании, дополнительно содержат поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой плуроник F68. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления антиоксидант представляет собой витамин E.

В другом аспекте изобретение относится к единому флакону, содержащему термостабильные лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, где композиция находится во флаконе.

В другом аспекте изобретение относится к способу хранения термостабильных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, включающему хранение композиций при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C или от приблизительно 25°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца, где вакцинный состав является термостабильным.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, включающему стадию лиофилизации эмульсии типа "масло в воде" с получением термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, где эмульсия типа "масло в воде" содержит (1) антиген, (2) метаболизируемое масло и (3) формирующий лепешку эксципиент, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой (а) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы; или (б) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы, где вакцинная композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, включающему стадию лиофилизации эмульсии типа "масло в воде" с получением термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, где эмульсия типа "масло в воде" содержит (1) адьювант, (2) метаболизируемое масло и (3) формирующий лепешку эксципиент, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой (1) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы; или (2) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы, где вакцинная композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид, выбранный из группы, состоящей из лактозы, рафинозы и лактулозы.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией содержит менее чем или приблизительно 1% (мас./об.) глицерина.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа

"масло в воде" перед лиофилизацией содержит менее чем или приблизительно 0,5% (мас./об.) глицерина.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией не содержит глицерина.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу в концентрации приблизительно 10% (мас./об.) в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой 5% (мас./об.) трегалозу в концентрации приблизительно 5% (мас./об.) в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы, где маннит в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 0,1% (мас./об.), и трегалоза в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 5% (мас./об.).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, формирующий лепешку эксципиент в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией представляет собой комбинацию маннита и трегалозы, где маннит в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 2,5% (мас./об.) и трегалоза в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 2,5% (мас./об.).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией не содержит глицерина.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 3 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, стадию лиофилизации проводят в одном флаконе.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа "масло в воде" при восстановлении имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа "масло в воде" при восстановлении имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 100 нм.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, концентрация антигена и/или адьюванта в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении проявляет деградацию не более чем или приблизительно 25% по сравнению с концентрацией антигена и/или адьюванта в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, лиофилизированная композиция имеет форму лепешки.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют перед восстановлением лиофилизированной композиции.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, лиофилизированная композиция имеет форму лепешки, где термостабильность определяют путем изучения сморщивания лепешки или покоричневения.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют после восстановления лиофилизированной композиции.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют путем изучения эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении в отношении расслоения.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, термостабильность определяют визуально.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, термостабиль-

ность определяют посредством анализа компонентов эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсию лиофилизируют в одном флаконе.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, восстановленная эмульсия имеет размер частиц с z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм.

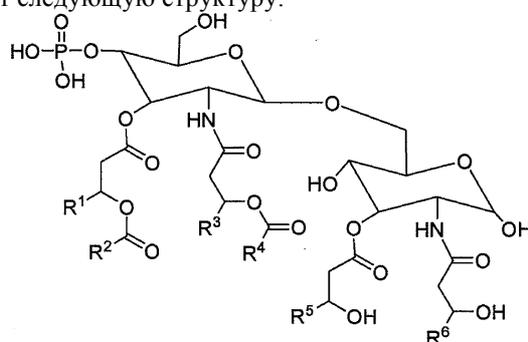
В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией содержит антиген и адъювант.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, антиген представляет собой полипептид, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, или патоген.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, адъювант представляет собой метаболизируемое масло. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, метаболизируемое масло-адъювант представляет собой сквален, синтетический сквален, масло из семян винограда, оливковое масло или синтетический изопреноид.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, антиген представляет собой полипептид, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, или патоген.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, адъювант представляет собой агонист TLR4. В некоторых вариантах осуществления, агонист TLR4 представляет собой MPL, 3d-MPL или синтетический GLA. В некоторых вариантах осуществления, адъювант на основе синтетического GLA имеет следующую структуру:



где R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой C₁₁-C₂₀-алкил; и

R² и R⁴ представляют собой C₉-C₂₀-алкил.

В некоторых вариантах осуществления, R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой C₁₁-алкил; и

R² и R⁴ представляют собой C₉-алкил.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, метаболизируемое масло представляет собой сквален, минеральное масло, масло из семян винограда, синтетический сквален или синтетический изопреноид.

В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция дополнительно содержит 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин-3-фосфохолин (POPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), яичный PC, лецитин, твин или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой плуроник F68. В некоторых вариантах осуществления вакцинальная композиция дополнительно содержит антиоксидант (например, витамин E).

В другом аспекте изобретение относится к способу стимуляции иммунного ответа у индивидуума, включающему (a) восстановление любой из термостабильных лиофилизованных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, в эмульсию типа "масло в воде"; и (b) введение эмульсии индивидууму, тем самым стимулируя иммунный ответ у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой неспецифический иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой антигенспецифический иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления эмульсию типа "масло в воде" вводят внутривенно или перорально. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит GLA. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек, собака или корова.

Следует понимать, что одно, несколько или все из свойств различных вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, можно комбинировать с получением других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут понятными специалисту в данной области.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что лиофилизация 2% об./об. SE в 5% мас./об. трегалозе сохраняла характеристики эмульсии. На фиг. 1А показан внешний вид эмульсии до лиофилизации (слева) в качестве лиофилизованной лепешки (в центре) и после восстановления лиофилизованной лепешки (справа). На фиг. 1В показаны объемные распределения размеров частиц, которые измеряли посредством динамиче-

ского рассеяния света (DLS).

На фиг. 2 показано, что лиофилизация значительно повышала физическую и pH-стабильность эмульсии при 37°C и химическую стабильность при 90°C. На фиг. 2А показан размер частиц в жидкой эмульсии перед лиофилизацией (закрашенный квадрат) и восстановленной лиофилизированной эмульсии (закрашенный круг) при хранении при 25°C (верхняя панель) или 37°C (нижняя панель) с течением времени. На фиг. 2В показано значение pH в жидкой эмульсии (закрашенный квадрат) и восстановленной лиофилизированной эмульсии (закрашенный круг) при хранении при 25°C (верхняя панель) или 37°C (нижняя панель) с течением времени. На фиг. 2С показано количество компонентов в эмульсии при хранении в условиях ускоренной деградации при 90°C с течением времени. Процент (%) происходящего из яиц фосфатидилхолина (жидкий яичный РС; закрашенный круг), сквалена (жидкий сквален; закрашенный треугольник) и α -токоферола (жидкий α -токоферол; закрашенный ромб) в жидкой эмульсии демонстрирует быстрые изменения концентрации компонентов по сравнению с происходящим из яиц фосфатидилхолином (лиофилизированный яичный РС; закрашенный квадрат), скваленом (лиофилизированный сквален; перевернутый закрашенный треугольник) и α -токоферолом (лиофилизированный α -токоферол; незакрашенный круг) в восстановленной лиофилизированной эмульсии.

На фиг. 3 показаны физико-химические изменения лиофилизированной эмульсии в процессе хранения при 25, 37, 50, 60 и 90°C, которую восстанавливали периодически на протяжении 1500 ч. На фиг. 3А показан размер частиц в восстановленной лиофилизированной эмульсии, хранившейся при 25°C (закрашенный круг), 37°C (закрашенный квадрат), 50°C (закрашенный треугольник), 60°C (перевернутый закрашенный треугольник) или 90°C (незакрашенный круг), с течением времени. На фиг. 3В показано значение pH в восстановленной лиофилизированной эмульсии, хранившейся при 25°C (закрашенный круг), 37°C (закрашенный квадрат), 50°C (закрашенный треугольник), 60°C (перевернутый закрашенный треугольник) или 90°C (незакрашенный круг), с течением времени. На фиг. 3С показана относительная ширина лепешки в лиофилизированной эмульсии, хранившейся при 25°C (закрашенный круг), 37°C (закрашенный квадрат), 50°C (закрашенный треугольник), 60°C (перевернутый закрашенный треугольник) или 90°C (незакрашенный круг) с течением времени. На фиг. 3D показано, что обратное плавление при измерении по уменьшению ширины лепешки обратно коррелировало с размером частиц, когда лиофилизированную эмульсию хранили при 60°C в стрессовых для стабильности условиях.

На фиг. 4 показано, что выбор эксципиента влияет на поддержание эмульсии после восстановления. На фиг. 4А показан индекс полидисперсности (PdI) состава для каждого эксципиента. На фиг. 4В показан размер частиц эмульсии (нМ) для каждого эксципиента. Слева направо: SE (насыпной материал), трегалоза (до лиофилизации), трегалоза, декстроза, лактоза, мальтоза, сахароза, рафиноза, манноза, фруктоза, лактулоза, рибоза, декстран 40000, PEG 3350, маннит, стахиоза, сорбит, дипиколиновая кислота (0,5%), никотиновая кислота (0,5%) и пролин.

На фиг. 5 показано образование и характеристики лепешки восстановленной 2% (об./об.) масляной SE в 5% (мас./об.) трегалозе, рибозе, манните или пролине. На фиг. 5А представлены изображения лепешек лиофилизированных эмульсий. На фиг. 5В представлено сравнение расслоения между восстановленными лиофилизированными составами с трегалозой и маннитом. Стрелками указано расслоение. На фиг. 5С представлено объемное распределение размеров частиц при измерении с использованием DLS.

На фиг. 6 показано, что выбор и химическая структура эксципиента влияют на термостабильность лепешки. На фиг. 6А показаны термограммы перехода плавления, полученные на устройстве для определения температуры плавления, для репрезентативных составов. На фиг. 6В представлено начало плавления лепешки и температура t_m для каждого эксципиента.

На фиг. 7 показано, что стабильность размера эмульсии зависит от морфологии лепешки и чувствительности к термически индуцируемому обратному плавлению. На фиг. 7А показано, что стабильность размера частиц зависит от типа используемого наполнителя и концентрации наполнителя. SE в эксципиентах: 5% декстрозе (закрашенный квадрат), 5% сахарозе (закрашенный ромб), 5% мальтозе (закрашенный перевернутый треугольник), 5% трегалозе (закрашенный круг) и 15% лактозе (закрашенный треугольник). На фиг. 7В показано, что скорость увеличения размера частиц коррелирует с температурой перехода, которая является свойством наполнителя. Пунктирная линия соответствует стрессовой для стабильности температуре 90°C.

На фиг. 8 показано, что состав с маннитом и эксципиентами 1 класса значительно повышал термостабильность лепешки без разрушения эмульсии. Сравнение T_m лепешки между составами 2% (об./об.) масляной SE в 5% (мас./об.), содержащими трегалозу, декстрозу, лактозу, мальтозу или сахарозу с 0,2, 5% (мас./об.) маннитом или без маннита.

На фиг. 9 показаны репрезентативные изображения жидких (слева), лиофилизированных (в центре) и восстановленных (справа) флаконов ID93+GLA-SE. Флаконы не подвергали стрессовым условиям (верхний ряд) или подвергали стрессовым условиям (нижний ряд) при 50°C в течение 30 суток.

На фиг. 10 показана охарактеризация частиц в жидких и восстановленных лиофилизированных образцах, содержащих ID93 и/или GLA-SE, как указано на обозначениях на легендах фигур. На фиг. 10А показан Z - средний диаметр из экспериментов с использованием DLS, На фиг. 10В показан индекс по-

лидисперсности (PdI) из экспериментов с использованием DLS, на фиг. 10C показано измерение зета-потенциала с использованием анализа отслеживания наночастиц и на фиг. 10D показано измерение концентрации частиц с использованием анализа отслеживания наночастиц. Закрашенные столбики соответствуют не подвергнутым стрессовым условиям образцам (т.е. хранившимся при 4°C в течение 30 суток) и незакрашенные столбики соответствуют подвергнутым стрессовым условиям образцам при 50°C в течение 30 суток.

На фиг. 11 показан восстанавливающий SDS-PAGE с окрашиванием находящейся в одном флаконе жидкости ID93+GLA-SE (дорожки 1 и 3) и восстановленных лиофилизированных образцов (дорожки 2 и 4). Образцы были либо не подвергнутыми стрессовым условиям (дорожки 1 и 2), либо подвергнутыми стрессовым условиям (дорожки 3 и 4) при 50°C в течение 30 суток. Не подвергнутые стрессовым условиям GLA-SE и ID93 показаны для сравнения (дорожки 5 и 6 соответственно).

На фиг. 12 показаны жидкие и восстановленные лиофилизированные образцы, содержавшие ID93 и/или GLA-SE. Концентрации GLA на фиг. 12A, DMPC на фиг. 12B и сквалена на фиг. 12C определяли из стандартного анализа кривых ВЭЖХ с обращенной фазой. На фиг. 12D представлена репрезентативная хроматограмма, демонстрирующая компоненты DMPC, сквален и GLA. Закрашенные столбики соответствуют не подвергнутым стрессовым условиям образцам и незакрашенные столбики соответствуют образцам, подвергнутым стрессовым условиям при 50°C в течение 30 суток.

На фиг. 13 показано, что лиофилизация ID93+GLA-SE препятствовала потере биологической активности вследствие термической нагрузки. Мышей иммунизировали физиологическим раствором или жидким, жидким однофлаконным или лиофилизированным однофлаконным составом ID93+GLA-SE, подвергнутым воздействию при 4 или 50°C в течение одного месяца. На фиг. 13A представлены количества В- и Т-клеток крови, которые были определены через 18 ч после иммунизации. На фиг. 13B представлены сывороточные титры специфичных к ID93 антител, которые определяли через три недели после первой иммунизации. На фиг. 13C показана частота 1B93-специфических CD4 Т-клеток в селезенке, которую оценивали в течение одного месяца после последней иммунизации посредством анализа продукции цитокинов с последующей рестимуляцией *in vitro* посредством ID93.

На фиг. 14 показано заражение аэрозолированными *M. tuberculosis* и подсчет у мышей, иммунизированных ID93+GLA-SE. Через один месяц после последней иммунизации животных заражали низкой дозой аэрозолированных *M. tuberculosis*. Бактериальную нагрузку в легких на фиг. 14A и селезенке на фиг. 14B определяли через три недели. Данные показаны в качестве среднего значения \pm s.d. для N=5-7 мышей/группа. Данные показаны для одного из двух экспериментов со сходными результатами. *, **, *** и **** указывают на $P < 0,05$, 0,01, 0,001 и 0,0001, соответственно, относительно физиологического раствора. n.s. - нет значимых отличий относительно физиологического раствора. Указаны статистические сравнения между образцами при 4 и 50°C.

На фиг. 15 представлены лиофилизированные и восстановленные совместно лиофилизированные составы ID93+SLA-SE после стрессовых условий в течение 30 суток при 50°C. Дублированные образцы показаны для моментов времени 0 и 30 суток.

На фиг. 16 показаны окрашенные кумасси изображения восстанавливающих гелей SDS-PAGE для восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. Наносили 1 мкг ID93+SLA-SE на дорожку.

На фиг. 17 показан размер частиц, определенный с использованием DLS, восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. На фиг. 17A показано распределение размера частиц (диаметр) по интенсивности. На фиг. 17B показан Z-средний диаметр. На фиг. 17C показан индекс полидисперсности (PdI). Планка погрешности соответствует 1 стандартному отклонению от среднего значения, $n=4$ прогона.

На фиг. 18 показан зета-потенциал (мВ), определенный с использованием DLS, восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, $n=4$ прогона.

На фиг. 19 показаны концентрации SLA (мкг/мл), определенные с использованием ВЭЖХ, в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+SLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, $n=3$ прогона.

На фиг. 20 показано формирование лепешки дублированных лиофилизированных образцов ID93+GLA-SE и внешний вид эмульсии после восстановления в нулевой момент времени (сразу после лиофилизации) и через один месяц после лиофилизации при хранении при 4, 25 и 37°C. Образец, который хранили при 4°C, соответствует контрольной лиофилизированной эмульсии, которую хранили в нормальных условиях хранения холодной цепи при 2-8°C. Лепешка выглядит белой и несколько усохшей без признаков покоричневения и восстановленная эмульсия не расслаивается через один час или через 24 ч после восстановления.

На фиг. 21 показаны характеристики стабильности дублированных лиофилизированных составов ID93+GLA-SE после хранения в течение 3 месяцев при 4, 25 и 37°C. На фиг. 21A показано, что лепешка не демонстрирует никаких дополнительных признаков оседания или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления. На

фиг. 21В в таблице показан Z-средний диаметр из экспериментов с DLS, индекс полидисперсности из экспериментов с DLS, pH и концентрация GLA в восстановленных эмульсиях. Планки погрешности соответствуют 1 SD от среднего значения для 2 флаконов для измерения pH и 2 флаконов × 3 разведения × 3 прогона для измерения размера частиц DLS и PDI. Представлены полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA (мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, n=3. Данные демонстрируют отсутствие заметного увеличения размера частиц, полидисперсности или pH восстановленной эмульсии после восстановления в случае любой из температур хранения. На фиг. 21С показаны изображения окрашенных кумасси гелей восстанавливающего SDS-PAGE для восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. Наносили 1 мкг ID93+SLA-SE на дорожку. Наличие полосы размером 98 кДа демонстрирует отсутствие заметной деградации полипептида ID93. На фиг. 21D представлено отслеживание с использованием ВЭЖХ компонентов эмульсии сквалена и DMPC. ВЭЖХ-анализ демонстрирует отсутствие заметной деградации при любой исследованной температуре компонента эмульсии DMPC или сквалена, на что указывает отсутствие появления дополнительных пиков или уширения пиков. На фиг. 21Е показаны полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA (мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, n=3 прогона. Через три месяца образцы восстановленной эмульсии демонстрируют небольшую поддающуюся оценке потерю GLA при 4 и 25°C (GLA в концентрации 51 мкг/мл (102%) в образце при 4°C и в концентрации 46 мкг/мл (92%) в образце при 25°C). Образец при 37°C может продемонстрировать тенденцию к некоторому снижению концентрации GLA до 42 мкг/мл (84%) через 3 месяца.

На фиг. 22 показаны характеристики стабильности дублированных лиофилизированных составов ID93+GLA-SE после хранения в течение 6 месяцев при 4, 25 и 37°C. Образцы, хранившиеся при 4°C, соответствуют контрольной лиофилизированной эмульсии, которую хранили в нормальных условиях хранения холодильной цепи при 2-8°C. На фиг. 22А показано, что лепешка не демонстрирует никаких дополнительных признаков оседания или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления. На фиг. 22В в таблице показан Z-средний диаметр из экспериментов с DLS и индекс полидисперсности из экспериментов с DLS, pH и концентрация GLA в восстановленных эмульсиях. Планки погрешности соответствуют 1 SD от среднего значения для 2 флаконов для измерения pH и 2 флаконов × 3 разведения × 3 прогона для измерения размера частиц DLS и PDI. Представлены полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA (мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, n=3. В таблице продемонстрировано, что pH сохраняется в физиологических диапазонах 7,21-7,49 для образцов, восстановленных и хранившихся в течение шести месяцев. На фиг. 22С показаны изображения окрашенных кумасси гелей восстанавливающего SDS-PAGE для восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. Наносили 1 мкг ID93+SLA-SE на дорожку. Наличие полосы размером 98 кДа демонстрирует отсутствие заметной деградации полипептида ID93 через шесть месяцев, на что указывает отсутствие появления дополнительных полос или уширения полосы 98 кДа. На фиг. 22D представлено отслеживание с использованием ВЭЖХ компонентов эмульсии сквалена и DMPC. ВЭЖХ-анализ демонстрирует отсутствие заметной деградации при любой исследованной температуре этих компонентов эмульсии, на что указывает отсутствие появления дополнительных пиков или уширения пиков. На фиг. 22Е показаны полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA (мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, n=3 прогона. Через шесть месяцев образцы восстановленной эмульсии демонстрируют небольшую поддающуюся оценке потерю GLA при 4 и 25°C (GLA в концентрации 47 мкг/мл (94%) в образце при 4°C и в концентрации 42 мкг/мл (84%) в образце при 25°C), однако образец, хранившийся при 37°C, демонстрирует потерю приблизительно 50% от первоначальной концентрации GLA, составлявшей 25 мкг/мл (84%).

На фиг. 23 показаны характеристики стабильности дублированных лиофилизированных составов ID93+GLA-SE после хранения в течение 9 месяцев при 4, 25 и 37°C. На фиг. 23А показано, что лепешка не демонстрирует никаких дополнительных признаков оседания или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления. Образец, хранившийся при 4°C, соответствует контрольной лиофилизированной эмульсии, которую хранили в нормальных условиях хранения холодильной цепи при 2-8°C. На фиг. 23В в таблице показан Z-средний диаметр из экспериментов с DLS и индекс полидисперсности из экспериментов с DLS, pH и концентрация GLA. Планки погрешности соответствуют 1 SD от среднего значения для 2 флаконов для измерения pH и 2 флаконов × 3 разведения × 3 прогона для измерения размера частиц DLS и PDI. Представлены полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA

(мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, $n=3$. В таблице продемонстрировано, что pH сохраняется в физиологических диапазонах 7,19-7,53 для образцов, восстановленных и хранившихся в течение девяти месяцев. На фиг. 23C показаны изображения окрашенных кумасси гелей восстанавливающего SDS-PAGE для восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. Наносили 1 мкг ID93+SLA-SE на дорожку. Наличие полосы размером 98 кДа демонстрирует отсутствие заметной деградации полипептида ID93 через девять месяцев, на что указывает отсутствие появления дополнительных полос или уширения полосы 98 кДа. На фиг. 23D представлено отслеживание с использованием ВЭЖХ компонентов эмульсии сквалена и DMPC. ВЭЖХ-анализ демонстрирует отсутствие заметной деградации при любой исследованной температуре этих компонентов эмульсии, на что указывает отсутствие появления дополнительных пиков или уширения пиков. На фиг. 23E показаны полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA (мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, $n=3$ прогона. Через девять месяцев образцы при 4 и 25°C демонстрируют отсутствие подающейся оценке утраты GLA (GLA в концентрации 40 мкг/мл (80%) в образце при 4°C и 40 мкг/мл (80%) в образце при 25°C), однако хранившийся при 37°C образец демонстрирует снижение первоначальной концентрации приблизительно на 69% (15 мкг/мл) после хранения в течение девяти месяцев.

На фиг. 23 показаны характеристики стабильности дублированных лиофилизированных составов ID93+GLA-SE после хранения в течение 12 месяцев при 4, 25 и 37°C. На фиг. 21A показано, что лепешка не демонстрирует никаких дополнительных признаков оседания или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления. Образец, хранившийся при 4°C, соответствует контрольной лиофилизированной эмульсии, которую хранили в нормальных условиях хранения холодильной цепи при 2°-8°C. На фиг. 24A показано, что лепешка не демонстрирует никаких дополнительных признаков оседания или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления. На фиг. 24B в таблице показан Z-средний диаметр из экспериментов с DLS и индекс полидисперсности из экспериментов с DLS, pH и концентрация GLA. Планки погрешности соответствуют 1 SD от среднего значения для 2 флаконов для измерения pH и 2 флаконов \times 3 разведения \times 3 прогона для измерения размера частиц DLS и PDI. Представлены полученные с использованием ВЭЖХ концентрации GLA (мкг/мл) в восстановленных совместно лиофилизированных составах ID93+GLA-SE. Планки погрешности соответствуют 1 стандартному отклонению от среднего значения, $n=3$. В таблице продемонстрировано, что pH сохраняется в физиологических диапазонах 7,15-7,48 для образцов, восстановленных и хранившихся в течение 12 месяцев. На фиг. 24C показаны изображения окрашенных кумасси гелей восстанавливающего SDS-PAGE для восстановленных совместно лиофилизированных составов ID93+SLA-SE. Наносили 1 мкг ID93+SLA-SE на дорожку. Наличие полосы размером 98 кДа демонстрирует отсутствие заметной деградации полипептида ID93 через двенадцать месяцев, на что указывает отсутствие появления дополнительных полос или уширения полосы 98 кДа.

На фиг. 25 показан эффект на лиофилизированные эмульсии добавления или удаления глицерина в качестве формирующего лепешку эксципиента, варьирования процента масла в эмульсии, включения 2% Tris в качестве регулирующего тоничность средства на протяжении диапазона концентраций GLA (нг/мл) при исследовании сразу после лиофилизации (0 суток) или после хранения в течение 30 суток при 50°C. На фиг. 25A показано, что все лиофилизированные эмульсионные составы с возрастающими концентрациями биологически деградируемого масла, сквалена (2-10% об./об.) и без 0,5% глицерина (обозначаемые как "отсутствие глицерина") образовывали лепешки привлекательного вида при лиофилизации без дальнейшего сморщивания или изменения цвета лепешки даже после 30 суток при 50°C по сравнению с составами, содержащими 0,5% глицерин об./об. (обозначаемыми как "с глицерином"). Лепешки, содержавшие глицерин, являются несколько усохшими и сплюснутыми как сразу после лиофилизации (момент времени 0 суток, так и после хранения в течение 30 суток при 50°C), причем образцы, хранившиеся при 50°C, продемонстрировали дальнейшее (усыхание) или разрушение структуры лепешки после хранения в течение 30 суток при 50°C. На фиг. 25B и 25C продемонстрировано, что отсутствуют заметные отличия как в размере частиц (Z-среднее значение, нм), фиг. 25B, так и полидисперсности (PDI), фиг. 25C для любого из составов после хранения при 50°C в течение 30 суток для любых составов, проявляющих размеры частиц приблизительно 200 нм или ниже после восстановления лепешки. На фиг. 25D показано, что присутствие 0,5% об./об. глицерина влияет на стабильность адьюванта GLA в лиофилизированном составе. Леофилизированные составы, содержавшие различные концентрации сквалена (2-10% об./об.), содержали варьирующую концентрацию адьюванта GLA. Концентрацию в нулевой моменте времени сравнивали с концентрацией GLA, полученной после хранения лиофилизированного состава в течение 30 суток при 50°C. Данные показывают, что все лиофилизированные составы, которые не содержали глицерина (показаны как "без глицерина") продемонстрировали более 85% процентов от первоначальной концентрации GLA, в то время как лиофилизированные составы, содержавшие глицерин, продемонстрировали более чем 80% снижение концентрации GLA после хранения при 50°C в течение одного месяца.

На фиг. 26 показаны четыре состава для лиофилизации, оцененных в отношении их способности к термической защите эмульсии GLA-SE, причем все оцениваемые составы для лиофилизации не содержали глицерина. Для фиг. 26-31 концентрацию адьюванта, GLA, увеличивали в эмульсии GLA-SE до 100 нг/мл, чтобы обеспечить более воспроизводимое количественное определение концентрации GLA после восстановления лиофилизированной лепешки. Составы оценивали в отношении образования и внешнего вида лепешки и расслоения после восстановления в момент времени 0 (сразу после лиофилизации), одна неделя (1 wk), 2 недели (2 wk), 1 месяц (1 mo) и 3 месяца (3 mo) после лиофилизации образцов, хранившихся в течение указанного периода времени при 4, 25, 37 и 50°C. На фиг. 26A показана 5% трегалоза отдельно (без глицерина), на фиг. 26B показана 5% трегалоза мас./об., 0,1% мас./об. маннит, на фиг. 26C показана 2,5% мас./об. трегалоза, 2,5% мас./об. маннит, на фиг. 26D показана 10% мас./об. трегалоза. Данные демонстрируют, что все из исследованных составов для лиофилизации, которые свободны от или которые не имеют глицерина, продемонстрировали образование лепешки привлекательного вида без изменения цвета или покоричневения лиофилизированной лепешки в любой из моментов времени (после лиофилизации по меньшей мере приблизительно 1 неделя, по меньшей мере приблизительно 2 недели, по меньшей мере приблизительно 1 месяц или по меньшей мере приблизительно 3 месяца) или при любой исследованной температуре (по меньшей мере приблизительно 4°C, по меньшей мере приблизительно 25°C, по меньшей мере приблизительно 37°C и по меньшей мере приблизительно 50°C). Также лепешки продемонстрировали небольшое или отсутствие оседания, или сморщивания, или изменения цвета и формировали эмульсии, которые не расслаивались при восстановлении.

На фиг. 27A-27D показано сравнение эмульсии GLA-SE до лиофилизации перед добавлением компонентов для лиофилизации (формирующие лепешку эксципиенты), как указано ниже, каждый набор столбиков соответствует 5% трегалозе отдельно (без глицерина), 5% трегалозе мас./об., 0,1% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту (обозначено на столбиках как "Pre Lyo"), эмульсии GLA-SE сразу после добавления компонентов для лиофилизации (обозначено на столбиках как "Lyo") и после лиофилизации с последующим восстановлением (обозначено как 0 или, если без обозначения, третий столбик в каждом наборе составов для лиофилизации) для каждого состава для лиофилизации. Первоначальное сравнение составов для лиофилизации продемонстрировало отсутствие заметных отличий между составами для лиофилизации с каждым составом, имеющими соответствующие характеристики восстановленной эмульсии (желаемые характеристики), включая размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм, отсутствие видимых агрегатов, измеряемое по полидисперсности, физиологическими значениями pH и отсутствием заметного уменьшения содержания GLA (величины, превышающее 90% от первоначального содержания).

На фиг. 28 показаны различные однофлаконные составы для лиофилизации GLA-SE (эмульсия, содержащая формирующие лепешку эксципиенты), как указано ниже, каждый набор столбиков соответствует 5% трегалозе отдельно (без глицерина), 5% трегалозе мас./об., 0,1% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, хранившимся в течение одной недели (1 wk), образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z - средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) как функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). На фиг. 28A показано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температурах в диапазоне 4-50°C проявляли желаемый размер частиц, составляющий менее чем приблизительно 200 нм, на фиг. 28B показано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемое отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности, на фиг. 28C показано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемые физиологические значения pH. На фиг. 28D показано, что все они не продемонстрировали заметной потери GLA (величины в диапазоне приблизительно 105-95%) при хранении в качестве лиофилизированной лепешки и восстановлении в качестве эмульсии GLA-SE по сравнению с исходной концентрацией GLA.

На фиг. 29 показаны различные однофлаконные составы для лиофилизации GLA-SE (эмульсия, содержащая формирующие лепешку эксципиенты), как указано ниже, каждый набор столбиков соответствует 5% трегалозе отдельно (без глицерина), 5% трегалозе мас./об., 0,1% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, хранившимся при 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4), для конкретного состава) в течение двух недель (2 wk). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z-средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). На фиг. 29A продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температурах 37 и 50°C в течение 2 недель после восстановления формировали эмульсии GLA-SE, которые проявляли желаемый размер частиц, составляющий менее чем приблизительно 200 нм, на фиг. 29B продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температурах 37 и 50°C в течение 2 недель после восстановления образовывали эмульсии GLA-SE, которые проявляли желаемое отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности, на фиг. 29C продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температурах 37 и 50°C в течение 2 недель после восстановления формировали эмульсии GLA-SE, ко-

торые проявляли желаемое физиологическое значение pH приблизительно pH 7,0. На фиг. 29D все составы для лиофилизации GLA-SE демонстрирует отсутствие заметной потери GLA (величины в диапазоне приблизительно 105-95%) от первоначальной концентрации GLA при хранении в качестве лиофилизированной лепешки при 37 или 50°C в течение 2 недель и восстановлении с образованием эмульсии GLA-SE.

На фиг. 30 показаны различные однофлаконные составы для лиофилизации GLA-SE (эмульсия, содержащая формирующие лепешку эксципенты), как указано ниже, каждый набор столбиков соответствует 5% трегалозе отдельно (без глицерина), 5% трегалозе мас./об., 0,1% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, хранившимся при 4°C (столбик 1), 25°C (столбик 2), 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4) для конкретного состава) в течение одного месяца (1 mo). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z-средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). На фиг. 30A продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемый размер частиц, составляющий менее чем приблизительно 200 нм, на фиг. 30B продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации, которые хранили при температуре в диапазоне 4-50°C, проявляли желаемое отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности, на фиг. 30C показано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемые физиологические значения pH. На фиг. 30D показано, что все они не продемонстрировали заметной потери GLA (величины в диапазоне приблизительно 105-95%) от первоначальной концентрации при хранении в качестве лиофилизированной лепешки при температурах в диапазоне 4-50°C в течение одного месяца и восстановлении в качестве эмульсии GLA-SE.

На фиг. 31 показаны различные однофлаконные составы для лиофилизации GLA-SE (эмульсия, содержащая формирующие лепешку эксципенты), как указано ниже, каждый набор столбиков соответствует 5% трегалозе отдельно (без глицерина), 5% трегалозе мас./об., 0,1% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, 2,5% мас./об. трегалозе, 2,5% мас./об. манниту, хранившимся при 4°C (столбик 1), 25°C (столбик 2), 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4) для конкретного состава для лиофилизации) в течение одного месяца (1 mo). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z-средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрация GLA (мг/мл). На фиг. 31A продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемый размер частиц, составляющий менее чем приблизительно 200 нм, на фиг. 31B продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемое отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности, на фиг. 31C продемонстрировано, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемое физиологическое значение pH по меньшей мере приблизительно pH 7,0.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте изобретение относится к термостабильным композициям, содержащим (1) метаболизируемое масло и (2) формирующий лепешку эксципиент. Термостабильные лиофилизированные вакцинные композиции, кроме того, необязательно включают антиген и/или адъювант. В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы. В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы. В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид, выбранный из группы, состоящей из лактозы, рафинозы и лактулозы. В некоторых вариантах осуществления композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и состав типа "масло в воде" перед лиофилизацией или при восстановлении содержит менее чем или приблизительно 1% (мас./об.) глицерина, менее чем или приблизительно 0,5% (мас./об.) глицерина или не содержит глицерина. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении. В некоторых вариантах осуществления композицию хранят в одном флаконе.

Как будет понятно специалисту в данной области, термины "термостабильная лиофилизированная вакцинная композиция", "лиофилизированная вакцинная композиция", "лиофилизированная термостабильная лепешка" и "лиофилизированная лепешка" используют в настоящем описании взаимозаменяемо. Этот термин, главным образом, относится к лиофилизированной стабильной эмульсии типа "масло в воде", содержащей биодegradуемое масло или метаболизируемое масло, и/или один или несколько антигенов, и/или один или несколько адъювантов, а также формирующие лепешку эксципенты, используемые для получения лепешки по изобретению. При восстановлении термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции образуется жидкая эмульсия типа "масло в воде", которая обладает желаемыми характеристиками по изобретению: средний размер частиц менее чем или приблизительно 200 нм, физиологическое значение pH, составляющее приблизительно 7,4, и отсутствие снижения концентрации каждого активного ингредиента (такого как антиген или адъювант), превышающего или равного приблизительно 25% от концентрации каждого активного ингредиента в первоначальном составе "масло в воде"

перед лиофилизацией, или какой-либо значительной деградации или изменения каждого активного ингредиента (например, антиген, адъювант), который пригоден для индукции или стимуляции иммунного ответа у индивидуума.

Как описано в настоящем описании, лиофилизированная вакцинная композиция является термостабильной. Например, композиция является стабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C. Такие композиции, кроме того, могут содержать подходящие эксципиенты, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты (носители), включая буферы, кислоты, основания, сахара, разбавители, консерванты и т.п., которые хорошо известны в данной области и описаны в настоящем описании. В другом аспекте изобретение относится к способам получения термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, описанной в настоящем описании.

В некоторых аспектах изобретение относится к способам стимуляции иммунного ответа у индивидуума, включающим восстановление термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, в эмульсию и введение эмульсии индивидууму. В некоторых вариантах осуществления эмульсия представляет собой эмульсию типа "масло в воде". В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой неспецифический иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой антигенспецифический иммунный ответ. Способ стимуляции иммунного ответа, описанный в настоящем описании, или восстановленную термостабильную лиофилизированную вакцинную композицию, описанную в настоящем описании, можно использовать отдельно или в комбинации с другими общепринятыми способами лечения (например, химиотерапевтические средства).

В некоторых вариантах осуществления указание на "приблизительно" величину или параметр в настоящем описании включает (и описывает) отклонения, которые относятся к самой этой величине и параметру. Например, описание, касающееся "приблизительно X", включает описание "X".

Определения.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем описании, включают аспекты и варианты осуществления "содержащий", "состоящий" и "по существу состоящий".

"Индивидуум" или "пациент" представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Млекопитающие также включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних питомцев (таких как кошки, собаки, лошади), приматов, мышей и крыс.

В рамках изобретения и в прилагаемой формуле изобретения, форма единственного числа включает множественное число упоминаемого объекта, если контекст явно не указывает на иное.

"Формирующий лепешку эксципиент" и "формирующий лепешку наполнитель" используют в настоящем описании взаимозаменяемо. Формирующий лепешку эксципиент относится к веществу, добавляемому к жидкому стабильному составу эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, который обеспечивает лепешку после лиофилизации. При восстановлении лиофилизированной лепешки образуется стабильная эмульсия, которая пригодна для доставки фармакологически активного лекарственного средства, включая вакцины по настоящему изобретению. В рамках изобретения формирующие лепешку эксципиенты представляют собой вещества, которые не разрушают эмульсию при восстановлении лиофилизированной лепешки.

Эксципиенты в рамках изобретения относятся к веществам, отличным от фармакологически активных лекарственных средств, которые включают в процесс производства или упаковывания для хранения или транспортировки фармакологически активного лекарственного средства, включая, но не ограничиваясь ими, лиофилизацию, и они участвуют в законченном фармацевтическом процессе.

Эксципиенты лиофилизации в рамках изобретения могут относиться к веществам, отличным от фармакологически активного лекарственного средства, которые включены в процесс лиофилизации, для участия в формировании или составлении подходящей структуры лепешки. Эксципиенты лиофилизации могут включать наполнители, буферы или солибилизаторы.

Общие способы.

Для применения настоящего изобретения на практике будут использоваться, если нет иных указаний, общепринятые способы молекулярной биологии, рекомбинантных ДНК, биохимии и химии, которые входят в пределы квалификации специалиста в данной области. Такие способы полностью пояснены в литературе. См., например, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *DNA Cloning*, volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed., 1984); Mullis et al., патент США № 4683195; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds., 1984); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); монографию *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Характеристики лиофилизированных вакцинных композиций.

Изобретение относится к термостабильным лиофилизированным вакцинным композициям, содержащим антиген и/или адъювант. В настоящем описании описано, что составы эмульсии типа "масло в воде" можно лиофилизировать и хранить, поддерживать или подвергать воздействию температур от при-

близительно 8°C до приблизительно 60°C, и они после восстановления формируют эмульсии, которые могут иметь одну или несколько из следующих характеристик: (1) не демонстрируют расслоения, (2) сохраняют желаемое значение pH на уровне физиологического значения 7,4, (3) поддерживают частицы с Z-средним диаметром, составляющим менее чем приблизительно 200 нм с небольшой агрегацией или без агрегации, (4) не проявляют снижения концентрации активного ингредиента, превышающего более чем или приблизительно 25% от исходного состава эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, или какой-либо значительной деградации или изменения каждого активного ингредиента (например, антигена, адьюванта), и (5) пригодны для индукции или стимуляции иммунного ответа у индивидуума.

Эти лиофилизированные составы содержат формирующие лепешку эксципиенты, включающие (a) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы и лактулозы; (b) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы; или (c) сахарид, выбранный из группы, состоящей из лактозы, рафинозы и лактулозы. Эти термостабильные составы являются усовершенствованием относительно уровня техники и могут значительно уменьшить более чем 50% потерю вакцинных составов ежегодно вследствие неуспеха поддержания условий хранения холодовой цепи в большинстве развитых стран. Условия хранения холодовой цепи описаны Centers for Disease Control, CDC и US Federal Drug Agency (UAFDA) на <http://www.vac-storagecdcpDF.pdf>. Более того, во многих областях развивающегося мира встречается температура окружающей среды более 25°C, таким образом, термостабильные вакцинные составы, описанные в настоящем описании, можно хранить, подвергать воздействию или поддерживать при температурах, превышающих температуру окружающей среды 25°C.

В одном аспекте желаемые характеристики термостабильности термостабильной лиофилизированной композиции состоят в том, что лиофилизированная композиция должна обладать определенными желаемыми характеристиками, включая длительную стабильность; малое время восстановления; сохранение внешнего вида лепешки после хранения, эквивалентного внешнему виду лепешки сразу после лиофилизации; сохранение характеристик первоначальной дозированной формы при восстановлении, включая свойства раствора, структуру или конформацию белков; и размер частиц и распределение частиц (Frank Kofi Bedu-Addo in Understanding Lyophilization Development. Pharmaceutical Technology). Дополнительные желаемые характеристики термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции могут включать одну или несколько из следующих характеристик, включая длительную стабильность при температурах выше 8°C, типичных для продуктов, хранящихся в условиях холодовой цепи; малое время восстановления; сохранение по существу сходного внешнего вида лепешки после хранения, воздействия или поддержания при приблизительно или выше 8°C, относительно внешнего вида сразу после лиофилизации; сохранение характеристик первоначальной дозированной формы (плюс или минус 25% от первоначальной концентрации или функции) у активных ингредиентов вакцины (активные ингредиенты включают, но не ограничиваются ими, концентрацию и/или конформацию антигена и концентрацию адьюванта), и сохранении при восстановлении свойств раствора, структуры или конформации белков, если они включены; и размер частиц и распределение частиц, не превышающие по меньшей мере или приблизительно средний размер частиц 200 нм.

В одном варианте осуществления термостабильная лепешка в рамках изобретения относится к лепешке, получаемой посредством лиофилизации в едином флаконе стабильной эмульсии (SE) типа "масло в воде" по изобретению, которая может содержать дополнительные активные ингредиенты по изобретению, включая антигены и/или адьюванты в присутствии подходящих формирующих лепешку эксципиентов по изобретению, которые при хранении или воздействии при хранении и транспортировке температур выше типичной температуры хранения холодовой цепи 2-8°C, и демонстрирует желаемые характеристики вакцинной эмульсии типа "масло в воде".

В одном варианте осуществления термостабильная вакцина в рамках изобретения, относится к вакцинной композиции, которая получена путем восстановления термостабильной лепешки/термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции по изобретению. Также в рамках изобретения термостабильная вакцина может относиться к термостабильной лиофилизированной композиции лепешки для восстановления в термостабильную вакцину.

Оценка термостабильности.

Термостабильность лиофилизированных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, можно оценивать в лиофилизированном состоянии перед восстановлением или после восстановления. Термостабильность лиофилизированных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, можно оценивать посредством визуального исследования и/или с помощью одного или нескольких анализов, описанных в настоящем описании. Эти анализы могут обеспечить оценку целостности эмульсии, антигена и/или адьюванта после лиофилизации и восстановления.

Анализ и наблюдение термостабильности, описанные в настоящем описании, можно проводить во время лиофилизации, через 1 ч после лиофилизации, через 6 ч после лиофилизации, через 12 ч после лиофилизации, через 24 ч после лиофилизации, 36 ч после лиофилизации, через 48 ч после лиофилизации, через 1 неделю после лиофилизации, через 2 недели после лиофилизации, через 1 месяц после лио-

филизации, через 2 месяца после лиофилизации, через 3 месяца после лиофилизации, через 4 месяца после лиофилизации, через 6 месяцев после лиофилизации, через 12 месяцев после лиофилизации или более. Перед проведением анализов и наблюдения, лиофилизированную композицию можно поддерживать, хранить или подвергать воздействию температур, превышающих или приблизительно равных 8°C, например превышающих или приблизительно равных 25°C, превышающих или приблизительно равных 37°C, или превышающих или приблизительно равных 50°C, или приблизительно 60°C.

Анализы и наблюдение термостабильности, описанные в настоящем описании, можно проводить при восстановлении лиофилизированной композиции, сразу после восстановления, через 1 ч после восстановления, через 6 ч после восстановления, через 12 ч после восстановления, через 24 ч после восстановления, через 36 ч после восстановления, через 48 ч после восстановления или через 1 неделю после восстановления. Перед восстановлением и проведением анализов и наблюдения лиофилизированную композицию можно поддерживать, хранить и подвергать воздействию температур, превышающих или равных приблизительно 8°C, например превышающих или равных приблизительно 25°C, превышающих или равных приблизительно 37°C, превышающих или равных приблизительно 50°C или при приблизительно 60°C.

Специалисту в данной области будет понятно, что настоящее изобретение предназначено для обеспечения лиофилизированных вакцинных композиций, которые можно хранить и/или транспортировать при температурах, более близких к температурам окружающей среды в развитых или развивающихся странах, таким образом, в некоторых вариантах осуществления лиофилизированную композицию поддерживают, хранят или подвергают воздействию более чем одной температуры или комбинации температур, превышающей или равной приблизительно 8°C, например превышающей или равной приблизительно 25°C, превышающей или равной приблизительно 37°C, превышающей или равной приблизительно 50°C или приблизительно 60°C.

В некоторых вариантах осуществления термостабильность лиофилизированных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, оценивают путем визуального наблюдения перед восстановлением. В других вариантах осуществления термостабильность лиофилизированных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, оценивают после восстановления с помощью одного или нескольких анализов, например биофизических и биохимических анализов.

В некоторых вариантах осуществления термостабильность лиофилизированных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, оценивают посредством визуального исследования после восстановления. В других вариантах осуществления термостабильность лиофилизированных вакцинных композиций, описанных в настоящем описании, оценивают после восстановления с помощью одного или нескольких анализов, например биофизических и биохимических анализов.

В одном варианте осуществления лиофилизированную лепешку, полученную путем лиофилизации состава эмульсии типа "масло в воде", можно наблюдать в отношении цвета и консистенции. В некоторых вариантах осуществления лепешка, описанная в настоящем описании, представляет собой материал, подобный пористой и губкообразной структуре, полученный в результате процесса лиофилизации; или лепешка представляет собой твердое содержимое, оставшееся после процесса лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления внешний вид лепешки может быть описан как губкообразная лепешка, приятная на вид лепешка и лепешка привлекательного вида. В некоторых вариантах осуществления лепешку можно визуальнo исследовать в отношении отсутствия растрескивания, спадения (которое также может быть описано как сморщивание, или отделение от боковых стенок флакона, опускание, или оседание верхушки лепешки, или уменьшение общего объема лепешки) и/или изменения цвета или изменения цвета или покоричневения. В некоторых вариантах осуществления лепешка может быть классифицирована как лепешка привлекательного вида, белая лепешка, белая лепешка привлекательного вида, губкообразная белая лепешка, белая лепешка с увеличенным объемом, коричневая лепешка, коричневеющая лепешка или сморщивающаяся/сморщенная лепешка. В некоторых вариантах осуществления изменение цвета или покоричневение в рамках изобретения относится к составу, который содержит восстанавливающие сахара (например, лактозу и мальтозу), которые при лиофилизации и хранении лепешки при температуре при или выше 8°, например при 25, 37 и/или 60°C могут подвергаться реакции Майяра или восстановлению сахаров, приводящим к изменению цвета исходной лепешки, что визуальнo приводит к оттенку лепешки от желтого до коричневого. В некоторых вариантах осуществления, если лепешка не образуется при лиофилизации, полученная композиция может быть охарактеризована как прозрачная пленка, тонкая пленка, толстая белая пленка или затвердевшие пузыри. В некоторых вариантах осуществления желаемые лепешки по изобретению относятся к лепешкам, которые после воздействия, хранения или поддержания лепешки при описанных температурах выше типичного хранения холодильной цепи 2-8°C или выше или приблизительно равных 8°C проявляют желаемые характеристики лиофилизированного вакцинного состава. ("Excipients used in lyophilization of small molecules" Ankit Bahetia, Lokesh Kumarb, Arvind K. Bansal, J. Excipients and Food Chem., 1(1), 2010; 41-54.)

В некоторых вариантах осуществления измеряют температуру плавления (Tm) лепешки, полученной в процессе лиофилизации.

В некоторых вариантах осуществления размер частиц эмульсии оценивают после восстановления

лиофилизированной композиции. Например, для оценки размера частиц можно использовать динамическое рассеяние света (DLS). В некоторых вариантах осуществления его сравнивают с размером частиц эмульсии перед лиофилизацией, например, в состоянии жидкой стабильной эмульсии перед лиофилизацией. В некоторых вариантах осуществления размер частиц эмульсии не сравнивают с размером частиц перед лиофилизацией. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, размер частиц определяют путем измерения Z-среднего диаметра (Z-Aved) жидкой лиофилизированной композиции. В конкретных вариантах осуществления указывают, что композиция является термостабильной, когда восстановленная жидкая эмульсия лиофилизированной композиции, поддерживаемая, хранившаяся или подвергаемой воздействию температуры, превышающей или равной приблизительно 8°C, имеет размер частиц с Z-средним диаметром, меньшим чем приблизительно 200 нМ, меньшим чем приблизительно 190 нМ, меньшим чем приблизительно 180 нМ, меньшим чем приблизительно 170 нМ, меньшим чем приблизительно 160 нМ, меньшим чем приблизительно 150 нМ, меньшим чем приблизительно 140 нМ, меньшим чем приблизительно 130 нМ, меньшим чем приблизительно 120 нМ, меньшим чем приблизительно 110 нМ, меньшим чем приблизительно 100 нМ или меньшим чем приблизительно 90 нМ, меньшим чем приблизительно 80 нМ, меньшим чем приблизительно 70 нМ или меньшим чем приблизительно 60 нМ. В конкретных вариантах осуществления восстановленная эмульсия имеет размер частиц с Z-средним диаметром в диапазоне от приблизительно 100 нМ до приблизительно 200 нМ.

В некоторых вариантах осуществления после восстановления лиофилизированной композиции оценивают индекс полидисперсности (PdI). Например, для оценки PdI можно использовать динамическое рассеяние света (DLS). В некоторых вариантах осуществления его сравнивают с PdI жидкой эмульсии перед лиофилизацией, например в состоянии жидкой стабильной эмульсии перед лиофилизацией.

В одном варианте осуществления после восстановления лиофилизированной композиции оценивают зета-потенциал. Например, для оценки зета-потенциала можно использовать динамическое рассеяние света (DLS). В некоторых вариантах осуществления его сравнивают с зета-потенциалом перед лиофилизацией, например, в состоянии жидкой стабильной эмульсии перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах осуществления после восстановления лиофилизированной композиции оценивают pH эмульсии. В некоторых вариантах осуществления его сравнивают с pH перед лиофилизацией, например, в состоянии жидкой стабильной эмульсии перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах осуществления после восстановления лиофилизированной композиции оценивают расслоение эмульсии.

В некоторых вариантах осуществления после восстановления лиофилизированной композиции оценивают % повреждение или % разрушение антигена, адьюванта и/или других компонентов лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах осуществления для оценки химической деградации компонентов при ее наличии используют обращено-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (RP-ВЭЖХ). В одном иллюстративном варианте осуществления проводят мониторинг химической деградации сквалена, DMPC и GLA с использованием ОФ-ВЭЖХ. В других вариантах осуществления для оценки деградации белкового антигена вакцины при его наличии в лиофилизированной композиции после восстановления используют окрашивание геля с использованием кумасси. Термостабильная композиция, описанная в настоящем описании, проявляет деградацию, потерю или разрушение не более чем или приблизительно 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% антигена и/или адьюванта или другого компонента после восстановления термостабильной лиофилизированной композиции, которую поддерживали при температуре, превышающей или приблизительно равной 8°C.

Характеристики термостабильности.

В одном аспекте лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем или приблизительно 8°C. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при приблизительно или более чем 9°C, при приблизительно или более чем 10°C, при приблизительно или более чем 11°C, при приблизительно или более чем 12°C, при приблизительно или более чем 13°C, при приблизительно или более чем 14°C, при приблизительно или более чем 15°C, при приблизительно или более чем 16°C, при приблизительно или более чем 17°C, при приблизительно или более чем 18°C, при приблизительно или более чем 19°C, при приблизительно или более чем 20°C, при приблизительно или более чем 25°C, при приблизительно или более чем 30°C, при приблизительно или более чем 32°C, при приблизительно или более чем 35°C, при приблизительно или более чем 37°C, при приблизительно или более чем 40°C, при приблизительно или более чем 42°C, при приблизительно или более чем 45°C, при приблизительно или более чем 50°C и при приблизительно или более чем 60°C. В других вариантах осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термо стабильными при от приблизительно 8°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C, от приблизительно 37°C до приблизительно 50°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 50°C, от приблизительно 8°C до приблизительно 37°C, от приблизительно 8°C до приблизительно 50°C или от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C. В одном иллюстративном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при или приблизительно при 25°C. В другом иллюстративном

стабильными при более чем 37°C в течение по меньшей мере шести месяцев. В другом иллюстративном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем 37°C в течение по меньшей мере двенадцати месяцев. В одном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем 37°C в течение неопределенного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термо стабильными при приблизительно или более чем 50°C в течение по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 1 суток, по меньшей мере 2 суток, по меньшей мере 3 суток, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 1,5 лет, по меньшей мере 2 лет, по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет и по меньшей мере 5 лет. В одном иллюстративном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем 50°C в течение по меньшей мере одного месяца. В другом иллюстративном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем 50°C в течение по меньшей мере трех месяцев. В другом иллюстративном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термо стабильными при более чем 50°C в течение по меньшей мере шести месяцев. В другом иллюстративном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем 50°C в течение по меньшей мере двенадцати месяцев. В одном варианте осуществления лиофилизированные вакцинные композиции, описанные в настоящем описании, являются термостабильными при более чем 50°C в течение неопределенного периода времени.

Экципиенты и средства для применения в термостабильных вакцинных композициях.

Изобретение относится к термостабильным лиофилизированным вакцинным композициям, содержащим антиген и/или адъювант. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат дополнительные агенты и/или эксципиенты, такие как формирующие лепешку эксципиенты, формирующие лепешку наполнители, буферные средства, солюбилизирующие средства, обеспечивающие изотоничность средства, поверхностно-активные вещества и/или эмульгаторы.

Экципиенты.

Экципиенты по изобретению можно использовать по отдельности или в комбинации с другими эксципиентами, которые включают, но не ограничиваются ими, формирующие лепешку эксципиенты, формирующие лепешку наполнители, буферные средства, солюбилизирующие средства, обеспечивающие изотоничность средства, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, противомикробные средства и/или модификаторы температуры спадения.

В некоторых вариантах осуществления эксципиенты представляют собой вещества, отличные от фармакологически активного лекарственного средства, которые включены в процесс производства, или полный цикл производства для хранения или транспортировки фармакологически активного лекарственного средства, включая, но не ограничиваясь ими, лиофилизацию, и они участвуют в законченном фармацевтическом процессе.

В некоторых вариантах осуществления эксципиент представляет собой вещество, добавляемое к жидкому стабильному составу эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, которое обеспечивает лепешку после лиофилизации.

Экципиенты, пригодные для вакцинных составов и/или лиофилизации, известны в данной области (См., например, Bahetia et al., 2010, J. Excipients and Food Chem., 1(1)41-54, Grabenstein JD. ImmunoFacts: Vaccines and Immunologic Drugs, 2012 (37th revision). St Louis, MO: Wolters Kluwer Health, 2011, Vaccine) и включают формирующие лепешку наполнители, буферные средства, солюбилизирующие средства, обеспечивающие изотоничность средства, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, противомикробные средства и/или модификаторы температуры спадения. Перечень эксципиентов в одобренных в настоящее время вакцинах может быть найден в Centers for Disease Control (см. Интернет на cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/B/excipient-table-2.pdf, September 2013, "Vaccine Excipient & Media Summary. Excipients Included in U.S. Vaccines, by Vaccine"), и он включает, но не ограничивается ими, сахарозу, D-маннозу, D-фруктозу, декстрозу, фосфат калия, пласдон С, безводную лактозу, микрокристаллическую целлюлозу, полакрилин калий, стеарат магния, целлюлозы ацетат фталат, спирт, ацетон, касторовое масло, протравный лакообразующий краситель на основе алюминия FD&C Yellow #6, сывороточный альбумин человека, эмбриональную телячью сыворотку, бикарбонат натрия, культуры диплоидных фибробластных клеток человека (WI-38), модифицированную способом Дульбек-ко среда Игла, гидроксид алюминия, хлорид бензэтония, формальдегид, глетеральдегид, аминокислоты, витамины, неорганические соли, сахара, глицерин, аспарагин, лимонную кислоту, фосфат калия, сульфат магния, цитрат аммония железа, лактозу, сульфат алюминия калия, гидроксифосфат алюминия, сульфат

калия алюминия, пептон, бычий экстракт, тимеросал (следовые количества), модифицированную среду Мюллера или Миллера, бета-пропиолактон, тимеросол (только флаконы с многократными дозами), одноосновный фосфат натрия, двухосновный фосфат натрия, одноосновный фосфат калия, хлорид калия, глутамат калия, хлорид кальция, тауродезоксихолат натрия, неомицина сульфат, полимиксин В, яичный белок, лактальбумин гидролизат и неомицина сульфат.

Формирующие лепешку эксципиенты/формирующие лепешку наполнители.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой вещество, добавляемое к жидкому стабильному составу эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, который обеспечивает лепешку после лиофилизации.

При восстановлении лиофилизированной лепешки образуется стабильная эмульсия типа "масло в воде", которая является пригодной для доставки фармакологически активного лекарственного средства, включая вакцины по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления формирующие лепешку эксципиенты представляют собой вещества, которые не разрушают эмульсию при восстановлении лепешки.

В некоторых вариантах осуществления средства, пригодные в качестве формирующих лепешку эксципиентов, также обозначаемые как наполнители, в рамках настоящего изобретения включают сахара/сахариды или сахара/сахариды в комбинации с сахарными спиртами. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, сахара/сахариды или сахара/сахариды в комбинации с сахарными спиртами пригодны в качестве наполнителей или формирующих лепешку эксципиентов. Они включают, но не ограничиваются ими, трегалозу, декстрозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, рафинозу, маннозу, стахиозу, фруктозу, лактулозу, глюкозу и необязательно глицерин, сорбит и/или маннит.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, стахиозы, фруктозы и лактулозы.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию сорбита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, стахиозы, фруктозы и лактулозы.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы, лактозы, рафинозы и лактулозы.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид, выбранный из группы, состоящей из лактозы, рафинозы и лактулозы.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид или сахарид в комбинации с сахарным спиртом в отсутствие глицерина. В других вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид или сахарид в комбинации с сахарным спиртом в присутствии менее чем приблизительно 1% мас./об. глицерина, менее чем приблизительно 0,5% глицерина или менее чем приблизительно 0,1% глицерина.

В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент представляет собой сахарид и сахарид присутствует в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией или в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,01% мас./об. до приблизительно 20% мас./об., от приблизительно 0,05% мас./об. до приблизительно 10% мас./об., от приблизительно 0,05% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 10% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 2,5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 1% мас./об., от приблизительно 2,5% мас./об. до приблизительно 10% мас./об., от приблизительно 2,5% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об., от приблизительно 2,5% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 1% мас./об. до приблизительно 2,5% мас./об., от приблизительно 5% мас./об. до приблизительно 10% мас./об. или в концентрации в диапазоне от приблизительно 5% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об. В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент присутствует в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией или в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении в концентрации приблизительно 5% мас./об. В некоторых вариантах осуществления формирующий лепешку эксципиент присутствует в концентрации приблизительно 0,01% мас./об., приблизительно 0,02% мас./об., приблизительно 0,03% мас./об., приблизительно 0,04% мас./об., приблизительно 0,05% мас./об., приблизительно 0,06% мас./об., приблизительно 0,07% мас./об., приблизительно 0,08% мас./об., приблизительно 0,09% мас./об., приблизительно 0,1% мас./об., приблизительно 0,2% мас./об., приблизительно 0,3% мас./об., приблизительно 0,4% мас./об., приблизительно 0,5% мас./об., приблизительно 0,6% мас./об., приблизительно 0,7% мас./об., приблизительно 0,8% мас./об., приблизительно 0,9% мас./об., приблизительно 1% мас./об., приблизительно 2% мас./об., приблизительно 3% мас./об., приблизительно 4% мас./об., приблизительно 5% мас./об., приблизительно 6% мас./об., приблизительно 7% мас./об., приблизительно 7,5% мас./об., приблизительно 8% мас./об., приблизительно 9% мас./об., приблизительно 10% мас./об., приблизительно 11% мас./об., приблизительно 12% мас./об., приблизительно 13% мас./об., приблизительно 14% мас./об., приблизительно 15% мас./об., приблизительно 16% мас./об., приблизительно 17% мас./об., приблизи-

0,05% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об., от приблизительно 0,05% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 0,05% мас./об. до приблизительно 2,5% мас./об., от приблизительно 0,05% мас./об. до приблизительно 1% мас./об., от приблизительно 0,05% мас./об. до приблизительно 0,1% мас./об., от приблизительно 0,1% мас./об. до приблизительно 10% мас./об., от приблизительно 0,1% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об., от приблизительно 0,1% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 0,1% мас./об. до приблизительно 2,5% мас./об., приблизительно 0,1% мас./об. до приблизительно 1% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 10% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 2,5% мас./об., от приблизительно 0,5% мас./об. до приблизительно 1% мас./об., от приблизительно 1% мас./об. до приблизительно 10% мас./об., от приблизительно 1% мас./об. до приблизительно 7,5% мас./об., от приблизительно 1% мас./об. до приблизительно 5% мас./об., от приблизительно 1% мас./об. до приблизительно 2,5% мас./об. или приблизительно 0,1% мас./об. В некоторых вариантах осуществления трегалоза присутствует в комбинации с маннитом, где трегалоза присутствует в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией или в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении в концентрации приблизительно 0,01% мас./об., приблизительно 0,02% мас./об., приблизительно 0,03% мас./об., приблизительно 0,04% мас./об., приблизительно 0,05% мас./об., приблизительно 0,06% мас./об., приблизительно 0,07% мас./об., приблизительно 0,08% мас./об., приблизительно 0,09% мас./об., приблизительно 0,1% мас./об., приблизительно 0,2% мас./об., приблизительно 0,3% мас./об., приблизительно 0,4% мас./об., приблизительно 0,5% мас./об., приблизительно 0,6% мас./об., приблизительно 0,7% мас./об., приблизительно 0,8% мас./об., приблизительно 0,9% мас./об., приблизительно 1% мас./об., приблизительно 2% мас./об., приблизительно 3% мас./об., приблизительно 4% мас./об., приблизительно 5% мас./об., приблизительно 6% мас./об., приблизительно 7% мас./об., приблизительно 7,5% мас./об., приблизительно 8% мас./об., приблизительно 9% мас./об., приблизительно 10% мас./об., приблизительно 11% мас./об., приблизительно 12% мас./об., приблизительно 13% мас./об., приблизительно 14% мас./об., приблизительно 15% мас./об., приблизительно 16% мас./об., приблизительно 17% мас./об., приблизительно 18% мас./об., приблизительно 19% мас./об. или приблизительно 20% мас./об., и маннит присутствует в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией или в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении в концентрации приблизительно 0,01% мас./об., приблизительно 0,02% мас./об., приблизительно 0,03% мас./об., приблизительно 0,04% мас./об., приблизительно 0,05% мас./об., приблизительно 0,06% мас./об., приблизительно 0,07% мас./об., приблизительно 0,08% мас./об., приблизительно 0,09% мас./об., приблизительно 0,1% мас./об., приблизительно 0,2% мас./об., приблизительно 0,3% мас./об., приблизительно 0,4% мас./об., приблизительно 0,5% мас./об., приблизительно 0,6% мас./об., приблизительно 0,7% мас./об., приблизительно 0,8% мас./об., приблизительно 0,9% мас./об., приблизительно 1% мас./об., приблизительно 1,5%, приблизительно 2% мас./об., приблизительно 2,5%, приблизительно 3% мас./об., приблизительно 4% мас./об., приблизительно 5% мас./об., приблизительно 6% мас./об., приблизительно 7% мас./об., приблизительно 7,5% мас./об., приблизительно 8% мас./об., приблизительно 9% мас./об., приблизительно 10% мас./об., приблизительно 11% мас./об., приблизительно 12% мас./об., приблизительно 13% мас./об., приблизительно 14% мас./об., приблизительно 15% мас./об., приблизительно 16% мас./об., приблизительно 17% мас./об., приблизительно 18% мас./об., приблизительно 19% мас./об. или приблизительно 20% мас./об. В некоторых вариантах осуществления трегалозу в комбинации с маннитом используют в присутствии менее чем приблизительно 1% мас./об. глицерина, менее чем приблизительно 0,5% глицерина, менее чем приблизительно 0,1% глицерина или используют без глицерина (% глицерина относится к концентрации глицерина в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией).

В других вариантах осуществления средства, пригодные в качестве формирующих лепешку эксципиентов, в рамках настоящего изобретения включают любую аминокислоту. Иллюстративные аминокислоты, пригодные в качестве наполнителей в рамках настоящего изобретения, включают аргинин, глицин, пролин, глутаминовую кислоту, метионин, цистеин, пролин и гистидин отдельно или в комбинации либо в качестве чистых молекул, либо в составе.

В других вариантах осуществления наполнители включают полимеры, такие как декстран и полиэтиленгликоль.

Буферные средства.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат буферное средство. Буферные средства, пригодные в качестве эксципиентов в рамках настоящего изобретения, включают Tris-ацетат, Tris-основание, Tris HCl, фосфат аммония, лимонную кислоту, цитрат натрия, цитрат калия, виннокаменную кислоту, фосфат натрия, хлорид цинка, аргинин и гистидин. В некоторых вариантах осуществления буферные средства включают регулирующие pH средства, такие как хлористоводородная кислота, гидроксид натрия и меглумин.

Солюбилизирующие средства.

В некоторых вариантах осуществления подходящие солюбилизирующие средства включают комплексообразующие эксципиенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), альфа-

циклодекстрин, гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP- β -CD). Также в качестве солюбилизирующих эксципиентов могут быть включены поверхностно-активные вещества, включая полисорбат 80 и твин. В качестве солюбилизирующих средств можно использовать другие сорастворители, известные в данной области, и они включают трет-бутиловый спирт, изопропиловый спирт, дихлорметан, этанол и ацетон.

Регулирующие тоничность средства для применения в качестве эксципиентов в рамках настоящего изобретения включают глицерин, хлорид натрия, сахарозу, маннит и декстрозу. Модификаторы температуры спадения включают декстран, гидроксиэтилкрахмал, фиколл и желатин. Противомикробные средства включают бензиловый спирт, фенол, м-крезол, метилпарабен, этилпарабен, тимеросол.

Обеспечивающие изотоничность средства.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат обеспечивающее изотоничность средство. В некоторых вариантах осуществления обеспечивающее изотоничность средство представляет собой глицерин. В одном конкретном варианте осуществления обеспечивающее изотоничность средство присутствует в концентрации приблизительно 0,36% об./об. в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией или в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении.

Поверхностно-активные вещества.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой плуроник F68. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в соотношении приблизительно 100:1 (масло:поверхностно-активное вещество). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации приблизительно 0,018% мас./об. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации приблизительно 0,0001% мас./об., приблизительно 0,0005% мас./об., приблизительно 0,001% мас./об., приблизительно 0,005% мас./об., приблизительно 0,01% мас./об., приблизительно 0,011% мас./об., приблизительно 0,012% мас./об., приблизительно 0,013% мас./об., приблизительно 0,014% мас./об., приблизительно 0,015% мас./об., приблизительно 0,016% мас./об., приблизительно 0,017% мас./об., приблизительно 0,018% мас./об., приблизительно 0,019% мас./об., приблизительно 0,02% мас./об., приблизительно 0,03% мас./об., приблизительно 0,04% мас./об., приблизительно 0,05% мас./об., приблизительно 0,06% мас./об., приблизительно 0,07% мас./об., приблизительно 0,08% мас./об., приблизительно 0,09% мас./об., приблизительно 0,1% мас./об., приблизительно 0,2% мас./об., приблизительно 0,3% мас./об., приблизительно 0,4% мас./об., приблизительно 0,5% мас./об., приблизительно 0,6% мас./об., приблизительно 0,7% мас./об., приблизительно 0,8% мас./об., приблизительно 0,9% мас./об. или приблизительно 1% мас./об. Проценты и соотношения, описанные в настоящем описании, относятся к соотношениям и процентам либо в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, либо в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении.

Эмульгаторы.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат эмульгатор. В некоторых вариантах осуществления эмульгатор представляет собой 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC). В некоторых вариантах осуществления эмульгатор представляет собой лецитин. В некоторых вариантах осуществления эмульгатор присутствует в соотношении приблизительно 1:5 (эмульгатор:масло). В некоторых вариантах осуществления эмульгатор присутствует в концентрации приблизительно 0,38% мас./об. В некоторых вариантах осуществления эмульгатор присутствует в концентрации приблизительно 0,002% мас./об., приблизительно 0,005% мас./об., приблизительно 0,010% мас./об., приблизительно 0,015% мас./об., приблизительно 0,020% мас./об., приблизительно 0,025% мас./об., приблизительно 0,030% мас./об., приблизительно 0,035% мас./об., приблизительно 0,040% мас./об., приблизительно 0,045% мас./об., приблизительно 0,050% мас./об., приблизительно 0,055% мас./об., приблизительно 0,060% мас./об., приблизительно 0,065% мас./об., приблизительно 0,070% мас./об., приблизительно 0,075% мас./об., приблизительно 0,080% мас./об., приблизительно 0,085% мас./об., приблизительно 0,090% мас./об., приблизительно 0,095% мас./об., приблизительно 0,10% мас./об., приблизительно 0,15% мас./об., приблизительно 0,20% мас./об., приблизительно 0,25% мас./об., приблизительно 0,30% мас./об., приблизительно 0,35% мас./об., приблизительно 0,40% мас./об., приблизительно 0,45% мас./об., приблизительно 0,50% мас./об., приблизительно 0,55% мас./об., приблизительно 0,60% мас./об., приблизительно 0,65% мас./об., приблизительно 0,70% мас./об., приблизительно 0,75% мас./об., приблизительно 0,80% мас./об., приблизительно 0,85% мас./об., приблизительно 0,90% мас./об., приблизительно 0,95% мас./об., приблизительно 1% мас./об., приблизительно 2% мас./об., приблизительно 3% мас./об., приблизительно 4% мас./об., приблизительно 5% мас./об., приблизительно 6% мас./об., приблизительно 7% мас./об., приблизительно 7,5% мас./об., приблизительно 8% мас./об., приблизительно 9% мас./об. или приблизительно 10% мас./об. Проценты и соотношения, описанные в настоящем описании, относятся к соотношениям и процентам либо в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, либо в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении.

Адьюванты для применения в термостабильных лиофилизированных вакцинных композициях.

В некоторых аспектах изобретения, описанных в настоящем описании, композиция, описанная в

настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцина) содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления адъювант предоставляют отдельно, например, для применения в качестве лекарственного средства. В других вариантах осуществления адъювант предоставляют в комбинации с антигеном. Адъюванты для применения в композициях, которые модифицируют иммунный ответ, хорошо известны в данной области. Например, адъюванты для применения в композициях, описанных в настоящем описании, могут содержать один или несколько иммуностимулирующих адъювантов, адъювант для доставки, неорганический адъювант или органический адъювант. Неограничивающие примеры адъювантов для применения в композициях, описанных в настоящем описании, могут быть найдены, среди прочих, в Barouch D.H., 2008, *Nature*, 455(7213):613-9; Morrow et al., 2008, *AIDS*, 22 (3):333-8; и McGeary et al., 2003, *Peptide Sci.*, 9(7):405-181.

В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцина) представляет собой иммуностимулирующий адъювант.

Иммуностимулирующие адъюванты могут представлять собой адъюванты, которые прямо действуют на иммунную систему, например, такие как цитокин, лиганд TLR или микробный токсин. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем описании, адъювант представляет собой адъювантный цитокин. Один или несколько цитокинов могут быть пригодными в качестве адъюванта отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными адъювантами в композиции, описанной в настоящем описании. Пригодные цитокины включают интерферон (IFN), интерлейкин (IL), хемокин, колониестимулирующий фактор или фактор некроза опухоли. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой IFN типа I, IFN типа II или IFN типа III. В некоторых вариантах осуществления интерферон представляет собой IFN- α , IFN- β , IFN- γ или IFN- λ и их подтипы (например, IFN- λ , IFN- λ 2 и IFN- λ 3). В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин.

Неограничивающие примеры интерлейкинов, которые можно использовать в качестве адъюванта в композиции, описанной в настоящем описании, включают IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-35 и IL-36. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой хемокин. В некоторых вариантах осуществления хемокин представляет собой CC-хемокин, CXC-хемокин, C-хемокин или CX3C-хемокин. Неограничивающие примеры CC-хемокинов, которые можно использовать в качестве адъюванта в композиции, описанной в настоящем описании, включают CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27 и CCL28. Неограничивающие примеры CXC-хемокинов, которые можно использовать в композиции, описанной в настоящем описании, включают CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16 и CXCL17. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой колониестимулирующий фактор. В некоторых вариантах осуществления колониестимулирующий фактор представляет собой гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) или макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF). В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой фактор некроза опухоли. Неограничивающие примеры белка семейства факторов некроза опухоли, которые можно использовать в качестве адъюванта в композиции, описанной в настоящем описании, включают TNF- α и 4-1BBL.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий адъювант представляет собой лиганд Toll-подобного рецептора (TLR) (например, агонист TLR). Один или несколько лигандов TLR могут быть пригодными в качестве адъюванта отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными адъювантами в композиции, описанной в настоящем описании. TLR включает трансмембранные рецепторы клеточной поверхности врожденной иммунной системы, которые сообщают клеткам-хозяевам способность к раннему распознаванию различных консервативных микробных молекулярных структур, которые могут присутствовать в или на большом количестве инфекционных патогенов. (например, Armant et al., 2002, *Genome Biol.*, 3(8):reviews 3011.1-3011.6; Fearon et al., 1996, *Science*, 272:50; Medzhitov et al., 1997 *Curr. Opin. Immunol.*, 9:4; Luster, 2002, *Curr. Opin. Immunol.*, 14:129; Lien et al., 2003, *Nat. Immunol.*, 4:1162; Medzhitov, 2001, *Nat. Rev. Immunol.*, 1:135; Takeda et al., 2003, *Ann Rev. Immunol.*, 21:335; Takeda et al., 2005, *Int. Immunol.*, 17:1; Kaisho et al., 2004, *Microbes Infect.*, 6:1388; Datta et al., 2003, *J. Immunol.*, 170:4102).

Индукция усиления опосредуемой TLR передачей сигнала инициации иммунных ответов через врожденную иммунную систему может быть осуществлена агонистами TLR (т.е. лигандом TLR), которые связывают TLR клеточной поверхности. Например, липополисахарид (LPS) может представлять собой агонист TLR через TLR2 или TLR4 (Tsan et al., 2004, *J. Leuk. Biol.*, 76:514; Tsan et al., 2004, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286:C739; Lin et al., 2005, *Shock*, 24:206); поли(инозин-цитидин) (поли-I:C) может представлять собой агонист TLR через TLR3 (Salem et al., 2006, *Vaccine*, 24:5119); последовательности

CpG (олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметилированный цитозин-гуанозин или динуклеотидные мотивы "CpG", например CpG 7909, Cooper et al., 2005, *AIDS*, 19:1473; CpG 10101 Bayes et al. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27:193; Vollmer et al., *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5:673; Vollmer et al., 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:2314; Deng et al., 2004, *J. Immunol.*, 173:5148) могут представлять собой агонисты TLR через TLR9 (Andaloussi et al., 2006, *Glia*, 54:526; Chen et al., 2006, *J. Immunol.*, 177:2373); пептидогликаны могут представлять собой агонисты TLR2 и/или TLR6 (Soboll et al., 2006, *Biol. Reprod.*, 75:131; Nakao et al., 2005, *J. Immunol.*, 174:1566); 3M003 (4-амино-2-(этоксиметил)- α,α -диметил-6,7,8,9-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-1-этанол гидрат, Mol. Wt. 318 Da from 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, которая также является источником родственных соединений 3M001 и 3M002; Gorden et al., 2005, *J. Immunol.*, 174:1259) может представлять собой агонист TLR7 (Johansen, 2005, *Clin. Exp. Allergy*, 35:1591) и/или агонист TLR8 (Johansen, 2005); флагеллин может представлять собой агонист TLR5 (Feuillet et al., 2006, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 103:12487); профилин может представлять собой агонист TLR11 (Hedhli et al., 2009, *Vaccine*, 27(16):2274-87); липопептид может представлять собой агонист TLR1, TLR2 и/или TLR6 (Gao et al., 2013, *Вакцина*, 31(26):2796-803); и антигены гепатита С могут действовать в качестве агонистов TLR через TLR7 и/или TLR9 (Lee et al., 2006, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 103:1828; Horsmans et al., 2005, *Hepatology*, 42:724). Известны другие агонисты TLR (например, Schirmbeck et al., 2003, *J. Immunol.*, 171:5198), и они могут использоваться в соответствии с некоторыми из описанных в настоящем описании вариантов осуществления.

Например, в качестве общей информации (см., например, патент США № 6544518) иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилированные CpG-динуклеотиды ("CpG"), известны в качестве адъювантов при введении как системным путем, так и на слизистые оболочки (WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., *J. Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie and Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6). CpG представляет собой сокращенное обозначение динуклеотидных мотивов цитозин-гуанозин, присутствующих в ДНК. Центральная роль мотива CG в иммуностимуляции была определена Krieg, *Nature*, 374, p546, 1995. Детальный анализ показал, что мотив CG должен находиться в определенном контексте последовательности и что такие последовательности являются общими в бактериальных ДНК, но редкими в ДНК позвоночных. Иммуностимулирующая последовательность часто представляет собой пурин, пурин, С, G, пиримидин, пиримидин; где динуклеотидный мотив CG не является метилированным, однако известно, что другие неметилированные последовательности CpG являются иммуностимулирующими и могут быть использованы в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения. CpG при составлении в вакцинах можно вводить в свободном растворе вместе со свободным антигеном (WO 96/02555; McCluskie and Davis, выше) или ковалентно конъюгированным с антигеном (публикация РСТ № WO 98/16247), или можно составлять с носителем, таким как гидроксид алюминия (например, Davis et al., выше, Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, 95(26), 15553-8).

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды для применения в качестве адъюванта по настоящему изобретению содержат два или более динуклеотидных CpG-мотива, разделенных по меньшей мере тремя, более предпочтительно по меньшей мере шестью или более нуклеотидами. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению, как правило, представляют собой дезоксинуклеотиды. В предпочтительном варианте осуществления межнуклеотидная связь в олигонуклеотиде представляет собой фосфородитионатную или более предпочтительно фосфоротионатную связь, хотя в объем изобретения входят фосфодиэфирные и другие межнуклеотидные связи, включая олигонуклеотиды со смежными межнуклеотидными связями. Способы получения фосфоротионатных олигонуклеотидов или фосфородитиоатов описаны в патентах США № 5666153, 5278302 и WO 95/26204.

Примеры предпочтительных олигонуклеотидов имеют последовательности, которые описаны в представленных ниже публикациях; для определенных описанных в настоящем описании вариантов осуществления последовательности предпочтительно содержат модифицированные фосфоротиоатом межнуклеотидные связи:

(1) CPG 7909: Cooper et al., "CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults", *AIDS*, 2005 Sep 23; 19(14):1473-9;

(2) CpG 10101: Bayes et al., "Gateways to clinical trials", *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2005 Apr; 27(3):193-219; и

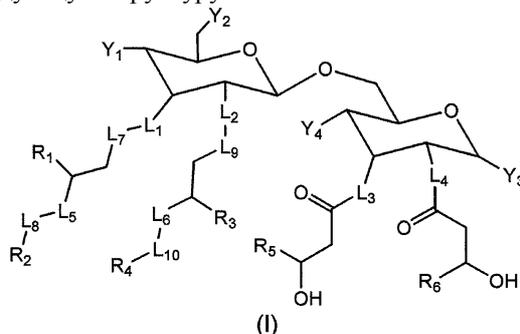
(3) Vollmer J., "Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodesoxynucleotide ligands for TLR9", *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2005 May; 5(5):673-682.

Альтернативные CpG-олигонуклеотиды могут включать варианты предпочтительных последовательностей, описанных в цитированных выше публикациях, которые отличаются тем, что они имеют несущественные замены, делеции и/или вставки в нуклеотидной последовательности. CpG-олигонуклеотиды, используемые в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, можно синтезировать любым способом, известным в данной области (например, EP 468520). Удобно, что такие олигонуклеотиды можно синтезировать с использованием автоматического устройства для синтеза. Олигонуклеотиды, как правило, представляют собой дезоксинуклеотиды. В предпочтительном варианте осуществления межнуклеотидная связь в олигонуклеотиде представляет собой фосфородитионатную или более предпочтительно фосфоротионатную связь, хотя фосфодиэфирные также входят в объем рассматриваемых в на-

стоящем описании вариантов осуществления. Также предусматриваются олигонуклеотиды, содержащие различные межнуклеотидные связи, например, смешанные фосфоротиоатные фосфодиэфир. Также можно использовать другие межнуклеотидные связи, которые стабилизируют олигонуклеотид.

В определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой агонист TLR4. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4, используемый в композиции по изобретению, содержит глюкопиранозиллипидный адъювант (GLA), такой как адъюванты, описанные в публикациях патентов США № US 2007/021017, US 2009/045033, US 2010/037466 и US 2010/0310602, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Например, в некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемую соль,

где L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 являются одинаковыми или различаются и независимо представляют собой -O-, -NH- или $-(CH_2)-$;

L_7 , L_8 , L_9 и L_{10} являются одинаковыми или различаются и независимо отсутствуют или представляют собой $-C(=O)-$;

Y_1 представляет собой кислотную функциональную группу;

Y_2 и Y_3 являются одинаковыми или различаются и независимо представляют собой -OH, -SH или кислотную функциональную группу;

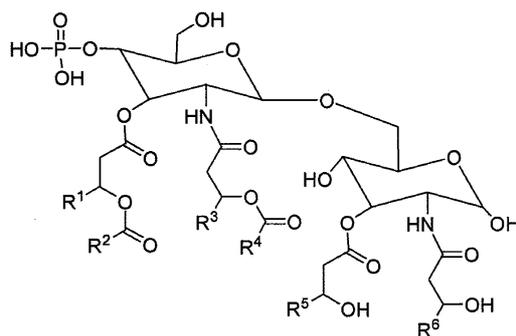
Y_4 представляет собой -OH или -SH;

R_1 , R_3 , R_5 и R_6 являются одинаковыми или различаются и независимо представляют собой C_{8-13} алкил; и

R_2 и R_4 являются одинаковыми или различаются и независимо представляют собой C_{6-11} алкил.

В некоторых вариантах осуществления синтетической структуры GLA R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{10} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_8 -алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

Например, в некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



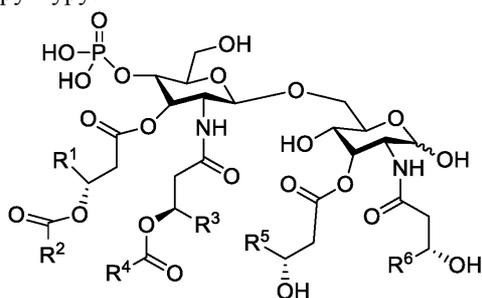
В конкретном варианте осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_{12} - C_{20} -алкил.

В другом конкретном варианте осуществления GLA имеет формулу, указанную выше, где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_{13} -алкил.

В другом конкретном варианте осуществления GLA имеет формулу, указанную выше, где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{10} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_8 -алкил.

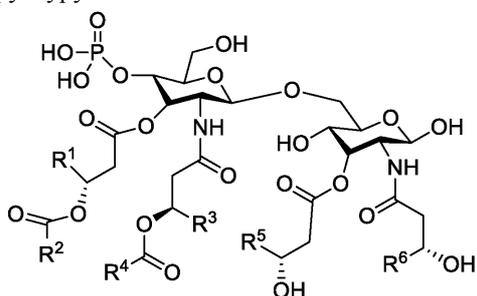
В другом конкретном варианте осуществления GLA имеет формулу, указанную выше, где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил. В определенных вариантах осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



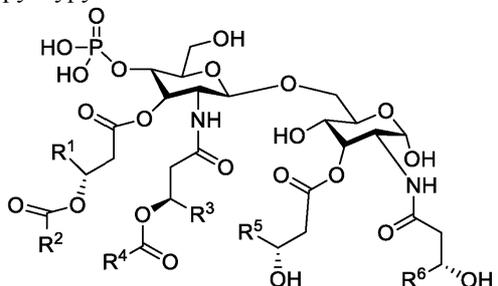
В некоторых вариантах осуществления представленной выше структуры GLA, R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



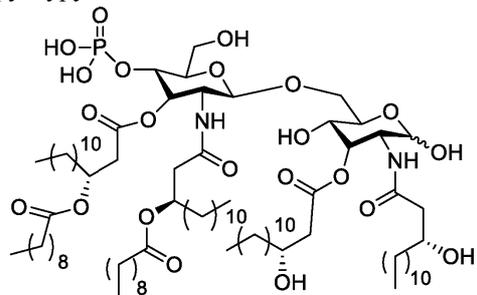
В некоторых вариантах осуществления описанной выше структуры GLA, R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:

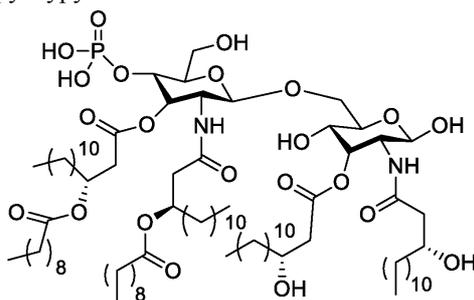


В некоторых вариантах осуществления описанной выше структуры GLA, R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил. В некоторых вариантах осуществления R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

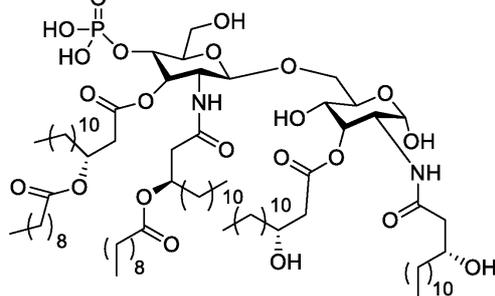
В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления агонист TLR4 представляет собой синтетический адъювант GLA, имеющий следующую структуру:



В другом варианте осуществления адъювант, используемый в композиции по изобретению, описанной в настоящем описании, представляет собой аттенуированное производное липида А (ALD). ALD представляют собой молекулы, подобные липиду А, которые изменены или сконструированы таким образом, что молекула проявляет меньше или отличающиеся неблагоприятные эффекты липида А. Эти неблагоприятные эффекты включают пирогенность, локальную реактивность Шварцмана и токсичность при оценке в анализе 50% летальной дозы для эмбриона курицы (CELD50). ALD, пригодные в соответствии с изобретением, включают монофосфориллипид А (MLA) и 3-деацелированный монофосфориллипид А (3D-MLA). MLA и 3D-MLA известны и их подробное описание в настоящем описании не требуется. См., например, патент США № 4436727, выданный 13 марта 1984 г., принадлежащий Ribi ImmunoChem Research, Inc., в котором описан монофосфориллипид А и его производство. В патенте США № 4912094 и в патенте США № 4912094 со свидетельством о произведенной повторной экспертизе на патентоспособность В1, выданном Myers et al., также принадлежащем Ribi ImmunoChem Research, Inc., описан 3-деацелированный монофосфориллипид А и способ его производства.

В некоторых вариантах осуществления также в определенные описанные в настоящем описании варианты осуществления в качестве адъювантов могут быть включены модификаторы ответа, такие как имидазохинолин и другие модификаторы иммунного ответа, известные в данной области. Некоторые предпочтительные модификаторы иммунного ответа на основе имидазохинолина включают в качестве неограничивающего примера резиквимод (R848), имиквимод и гардиквимод (Hemmi et al., 2002, Nat. Immunol., 3:196; Gibson et al., 2002, Cell. Immunol., 218:74; Gorden et al., 2005, J. Immunol. 174:1259); эти и другие модификаторы иммунного ответа на основе имидазохинолина в соответствующих условиях также могут обладать активностью агониста TLR, как описано в настоящем описании. Другими модификаторами иммунного ответа являются иммунные модификаторы на основе нуклеиновых кислот с двойной структурой стебель-петля (dSLIM). Конкретные примеры dSLIM, которые предусматриваются для применения в некоторых описанных в настоящем описании вариантах осуществления, могут быть найдены в Schmidt et al., 2006, Allergy, 61:56; Weihrauch et al., 2005, Clin. Cancer. Res., 11(16):5993-6001; Modern Biopharmaceuticals, J. Knablein (Editor), John Wiley & Sons, December 6, 2005 (dSLIM, обсуждаемый на с. с 183 по ~200); и Mologen AG (Berlin, FRG: [опубликованный через Интернет 8/18/06, см. Интернет на mologen.com/English/04.20-dSLIM.shtml]).

В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании, представляет собой полисахарид, происходящий из бактерий или растений. Неограничивающие примеры адъювантов на основе полисахаридов, которые можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными адъювантами в композиции, описанной в настоящем описании, включают глюканы (например, бета-глюканы), декстраны (например, сульфатированные и диэтиламиноэтил-декстраны), глюкоманнаны, галактоманнаны, леваны, ксиланы, фруктаны (например, инулин), хитозан, эндотоксины (например, липополисахарид), биобран MGN-3, полисахариды из *Actinidia eriantha*, элдексомер и их варианты.

В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в на-

стоящем описании, представляет собой протеосому или ее субъединицу. В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании, содержит идентичные или отличающиеся антигенные пептидные последовательности, собранные вокруг лизинового сердцевина. В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании, представляет собой токсин (например, бактериальный токсин). В некоторых вариантах осуществления токсин происходит из одной или нескольких бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Escherichia coli*, *Vibrio Cholerae*, *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis*.

В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцина) представляет собой адъювант для доставки. Адъювант для доставки может служить в качестве адъюванта и/или может доставлять антиген. Неограничивающие примеры адъюванта, который можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными адъювантами в композиции, описанной в настоящем описании, включают минеральные соли (например, фосфат кальция), эмульсии (например, сквален в воде), липосомы (например, липосомы DPPC:холестерин), вирусомы (например, иммуностимулирующие восстановленные вирусомы вируса гриппа) и микросферы.

Другие адъюванты для применения в соответствии с некоторыми описанными в настоящем описании вариантами осуществления включают блок-сополимер или биodeградируемый полимер, который относится к классу полимерных соединений, которые известны специалистам в данной области. Примеры блок-сополимера или биodeградируемого полимера, который может быть включен в композицию, описанную в настоящем описании, включают Pluronic® L121 (BASF Corp., Mount Olive, NJ; см., например, Yeh et al., 1996, Pharm. Res., 13:1693; патент США № 5565209), CRL1005 (например, Triozzi et al., 1997, Clin. Cane. Res., 3:2355), сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA), полимолочную кислоту (PLA), сополимер D,L-лактида и гликолида (PLG) и поли-I:C. (См., например, Powell and Newman, "Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, New York).

В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцина) представляет собой органический адъювант. Органические адъюванты могут представлять собой адъюванты, которые происходят из живых организмов или химически содержат углерод. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой пептид, происходящий из стенки микробной стенки (например, мурамилдипептид и его варианты). В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой 6,6'-димиколат трегалозы или его варианты. См. Schwenecker et al., 2013, Immunobiology, 218(4):664-73. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой стеарилтирозин.

Сапонины и миметики сапонинов, включая QS21 и структурно родственные соединения, обеспечивающие сходные эффекты и называемые в настоящем описании миметиками QS21 (см., например, патент США № 5057540; EP 0362279 B1; WO 95/17210), алкалоиды растений, такие как томатин, детергенты, такие как (но не ограничиваясь ими) сапонин, полисорбат 80, Span 85 и стеарилтирозин, модификатор иммунного ответа на основе имидазохинолина, и иммунный модификатор с двойной структурой стельбель-петля (dSLIM, например, Weeratna et al., 2005, Vaccine, 23:5263) можно использовать в качестве адъюванта в соответствии с определенными описанными в настоящем описании вариантами осуществления.

В некоторых вариантах осуществления адъювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании, представляет собой сапонин или миметик сапонины. Детергенты, включающие сапонины, описаны, например, в патенте США 6544518; Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996, Phytomedicine 2:363-386), патенте США № 5057540, Kensil, Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst., 1996, 12(1-2):1-55; и EP 0362279 B1. Структуры в форме частиц, называемые иммуностимулирующими комплексами (ISCOMS), содержащие фракции Quil A (сапонин), являются гемолитическими и используются в производстве вакцин (Morein, B., EP 0109942 B1). Описано, что эти структуры обладают адъювантной активностью (EP 0109942 B1; WO 96/11711). Гемолитические сапонины QS21 и QS17 (очищенные с использованием ВЭЖХ фракции Quil A) описаны в качестве мощных системных адъювантов, и способ их производства описан в патенте США № 5057540 и EP 0362279 B1. QS21 может содержать очищенную с использованием ВЭЖХ нетоксичную фракцию, полученную из коры *Quillaja Saponaria Molina*. Получение QS21 описано в патенте США № 5057540 (также см. патенты США № 6936255, 7029678 и 6932972). Также в этих ссылках описано применение QS7 (негемолитическая фракция Quil-A), который действует в качестве мощного адъюванта для системных вакцин. Применение QS21, кроме того, описано в Kensil et al. (1991, J. Immunology, 146:431-437). Также известны комбинации QS21 и полисорбата или циклодекстрина (WO 99/10008). Конкретные адъювантные системы, содержащие фракции QuilA, такие как QS21 и QS7, описаны в WO 96/33739 и WO 96/11711. Другие сапонины, которые используют в исследованиях с системной вакцинацией, включают сапонины, происходящие из других видов растений, таких как *Gur-sophila* и *Saponaria* (Bomford et al., Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой "иммуностимулирующие комплексы", известные как ISCOMS (например, патенты США № 6869607, 6846489, 6027732, 4981684), включая ISCOMATRIX® на основе сапонины, который является коммерчески доступным, например, от

Iscotec (Stockholm, Швеция) и CSL Ltd. (Parkville, Victoria, Австралия).

Эсцин представляет собой другой детергент, родственный сапонинам, для применения в адьювантных композициях согласно вариантам осуществления, описанным в настоящем описании. Эсцин описан в Merck index (12th ed.: запись 3737) в качестве смеси сапонинов, встречающейся в семенах конского каштана *Aesculus hippocastanum*. Описано его выделение посредством хроматографии и очистки (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch*, 4, 213 (1953)) с использованием ионообменных смол (Erbring et al., патент США № 3238190). Фракции эсцина (также известного как аэсцин) были очищены, и было показано, что они являются биологически активными (Yoshikawa M. et al. (*Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1996 August; 44(8):1454-1464)). Дигитонин является другим детергентом, также описанным в Merck index (12th ed., запись 3204) в качестве сапонины, происходящего из семян *Digitalis purpurea* и очищаемого по методике, описанной Gisvold et al., *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 664; и Rubenstroth-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621.

В некоторых вариантах осуществления адьювант, используемый в композиции, описанной в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцина) представляет собой неорганический адьювант. Неорганические адьюванты могут представлять собой адьюванты, которые, как правило, имеют не углеродную основу, например, такие как минеральные соли, эмульсии и фосфаты кальция. Адьюванты на основе минеральных солей, описанные в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, соединения на основе алюминия, такие как фосфат алюминия и гидроксид алюминия. В рамках изобретения, адьюванты на основе фосфата кальция включают, но не ограничиваются ими, ионы кальция (Ca^{2+}) с ортофосфатами (PO_4^{3-}), метафосфатами (PO_3^-) или пиррофосфатами ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$).

Как также описано выше, одним типом адьюванта для применения в композиции, как описано в настоящем описании, могут быть адьюванты на основе алюминия, которые обычно называют "квасцами". Адьювантные квасцы имеют следующую основу: оксигидроксид алюминия; гидроксифосфат алюминия или различные запатентованные соли. Вакцины, в которых используются адьюванты на основе квасцов, могут включать вакцины от штаммов столбняка, HPV, гепатита А, инактивированного вируса полиомиелита и других антигенов, как описано в настоящем описании. Адьюванты на основе квасцов являются преимущественными, поскольку они имеют хорошие показатели безопасности, усиливают антительные ответы, стабилизируют антигены, и их крупномасштабное получение является относительно простым (Edelman, 2002, *Mol. Biotechnol.*, 21:129-148; Edelman, R., 1980, *Rev. Infect. Dis.*, 2:370-383).

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат адьювант. В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой агонист TLR4. В некоторых вариантах осуществления адьювант присутствует в концентрации от приблизительно 0,5 мкг/мл до приблизительно 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления адьювант присутствует в концентрации приблизительно 0,5 мкг/мл, приблизительно 1 мкг/мл, приблизительно 2 мкг/мл, приблизительно 3 мкг/мл, приблизительно 4 мкг/мл, приблизительно 5 мкг/мл, приблизительно 6 мкг/мл, приблизительно 7 мкг/мл, приблизительно 8 мкг/мл, приблизительно 9 мкг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 20 мкг/мл, приблизительно 30 мкг/мл, приблизительно 40 мкг/мл, приблизительно 50 мкг/мл, приблизительно 60 мкг/мл, приблизительно 70 мкг/мл, приблизительно 80 мкг/мл, приблизительно 90 мкг/мл или приблизительно 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления адьювант представляет собой MPL или GLA, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления адьювант присутствует в концентрации приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл или приблизительно 12 мг/мл.

Подходящие адьюванты для применения в определенных композициях, описанных в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцинная композиция) включают коммерчески доступные адьюванты, например, такие как неполный адьювант Фрейнда и полный адьювант (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); адьювант 65 от Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 и его производные (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); AddaVax (InvivoGen); MF59 (Novartis); AS03 (GlaxoSmithKline); AS01B (GlaxoSmithKline); AS02A (GlaxoSmithKline).

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем описании, включают композиции (например, термостабильные лиофилизированные вакцинные композиции), которые содержат один адьювант и по меньшей мере еще один адьювант, который отличается от первого адьюванта. Например, композиция, описанная в настоящем описании, может содержать GLA и второй адьювант, отличный от GLA. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит два, три, четыре или пять адьювантов. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит два адьюванта.

Адьювант, как описано в настоящем описании, включает адьювант, который при введении индивидууму, такому как человек (например, пациент-человек), не являющийся человеком примат, млекопитающее или другой высший эукариотический организм, для которого подтверждено, что он имеет иммунную систему, способен изменять (т.е. повышать или снижать статистически значимым образом, и в некоторых вариантах осуществления усиливать или увеличивать) эффективность и/или длительность

иммунного ответа. (См., например, Powell and Newman, "Vaccine design - The Subunit and Adjuvant Approach", 1995, Plenum Press, New York.) В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем описании GLA и требуемый антиген и необязательно один или несколько адъювантов, таким образом, могут изменять, например, индуцировать или усиливать, иммунный ответ, который направлен против требуемого антигена.

Антигены для применения в термостабильных лиофилизированных вакцинных композициях.

В некоторых вариантах осуществления термостабильную вакцинную композицию используют для индукции или усиления иммунной реактивности или иммунного ответа хозяина на антиген.

В некоторых вариантах осуществления антиген может уже присутствовать в хозяине, такой как аутоиммунный антиген, аллерген или антиген злокачественной опухоли, и вакцинная композиция может включать только стабильную эмульсию и необязательно адъювант, который при введении индуцирует или усиливает иммунную реактивность в отношении антигена, уже присутствующего у индивидуума. Это введение вакцинной композиции, содержащей термостабильную лиофилизированную эмульсию и адъювант для индукции иммунного ответа на антиген, уже присутствующий у хозяина, в рамках изобретения, представляет собой монотерапию.

В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция, описанная в настоящем описании, содержит один или несколько антигенов.

Антиген для применения в некоторых вариантах осуществления описанных в настоящем описании композиций и способов получения и применения таких композиций, может представлять собой любой эпитоп-мишень, молекулу (включая биомолекулу), молекулярный комплекс (включая молекулярные комплексы, которые содержат биомолекулы), субклеточную структуру, клетку или ткань, против которых является желательной индукция или усиление иммунной реактивности у индивидуума. Часто термин "антиген" относится к представляющему интерес полипептидному антигену. Однако антиген в рамках изобретения также может относиться к рекомбинантной конструкции, которая кодирует представляющий интерес полипептидный антиген (например, экспрессирующую конструкцию). В определенных предпочтительных вариантах осуществления антиген может представлять собой, или может происходить из, или может быть иммунологически перекрестно реагирующим с инфекционным патогеном и/или эпитопом, биомолекулой, клеткой или тканью, которые ассоциированы с инфекцией, злокачественной опухолью, аутоиммунным заболеванием, аллергией, астмой или любым другим состоянием, где является желательной или полезной стимуляция антигенспецифического иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления антиген может присутствовать в любой концентрации, достаточной для индукции или усиления иммунной реактивности у индивидуума на желаемом уровне. В некоторых вариантах осуществления антиген может присутствовать в диапазоне концентраций от приблизительно 0,1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 2,5 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от приблизительно 2,5 мкг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 2,5 мкг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 5 мкг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 2,5 мкг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до приблизительно 2,5 мкг/мл, приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 2,5 мкг/мл, или от приблизительно 0,1 мкг/мл до приблизительно 1 мкг/мл. Концентрации, описанные в настоящем описании, относятся к концентрациям антигена либо в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, либо в эмульсии типа "масло в воде" после восстановления.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцинная композиция) содержат антиген или антигенную композицию, способные индуцировать иммунный ответ против патогена человека или другого млекопитающего, причем антиген или антигенная композиция могут включать композицию, происходящую из вируса, такого как ВИЧ-1 (как например, tat, nef, gp120 или gp160), вирусы герпеса человека, как например, gD или его производные или предранний белок, такой как ICP27 из HSV1 или HSV2, цитомегаловирус ((особенно человека) (как например, dB или его производные), ротавирус (включая живые аттенуированные вирусы), вирус Эпштейна-Барр (как например, др350 или его производные), вирус Varicella Zoster (как например, gp1, П и IE63), или вирус гепатита, такой как вирус гепатита В (например, поверхностный антиген вируса гепатита В или его производное), вирус гепатита А, вирус гепатита С и вирус гепатита Е, или другие вирусные патогены, такие как парамиксовирусы: респираторно-синцитиальный вирус (как, например, белки F и G или их производные), вирус парагриппа, вирус кори, вирус свинки, вирусы папилломы человека (например, HPV6, 11, 16, 18 и т.д.), флавивирусы (например, вирус желтой лихорадки, вирус Денге, вирус клещевого энцефалита, вирус японского энцефалита) или вирус гриппа (целый живой или инактивированный вирус, расщепленный вакцинный вирус, выращенный в яйцах или клетках MDCK, или целые виросомы flu (как описано в Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920), или его очищенные

или рекомбинантные белки, такие как белки HA, NP, NA, или M, или их комбинации).

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцинная композиция) содержат антиген или антигенную композицию, способную индуцировать иммунный ответ против патогена человека или другого млекопитающего, причем антиген или антигенная композиция могут включать композицию, происходящую из одного или нескольких бактериальных патогенов, таких как *Neisseria* spp, включая *N. gonorrhoea* и *N. meningitidis* (например, капсульные полисахариды и их конъюгаты, трансферрин-связывающие белки, лактоферрин-связывающие белки, PilC, адгезины); *S. pyogenes* (например, белки M или их фрагменты, протеаза C5A, липотейхоевые кислоты), *S. agalactiae*, *S. mutans*: *H. ducreyi*; *Moraxella* spp, включая *M. catarrhalis*, также известные как *Branhamella catarrhalis* (например высокомолекулярные и низкомолекулярные адгезины и инвазины); *Bordetella* spp, включая *B. pertussis* (например, пертактин, коклюшный токсин или его производные, нитчатый гемагглютинин, аденилатциклаза, фимбрии), *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., включая *M. tuberculosis* (например ESAT6, антиген 85A, -B или -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*,

M. paratuberculosis, *M. smegmatis*; *Legionella* spp, включая *L. pneumophila*; *Escherichia* spp, включая энтеротоксические *E. Coli* (например, факторы колонизации, термолабильный токсин или его производные, термостабильный токсин или его производные), энтерогеморрагические *E.coli*, энтеропатогенные *E.coli* (например, токсин, подобный шига-токсину, или его производные); *Vibrio* spp, включая *V. cholerae* (например холерный токсин или его производные); *Shigella* spp, включая *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp, включая *Y. enterocolitica* (например, белок Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter* spp, включая *C. Jejuni* (например, токсины, адгезины и инвазины) и *C. coli*; *Salmonella* spp, включая *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., включая *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp, включая *H. pylori* (например, уреаза, каталаза, вакуолирующий токсин); *Pseudomonas* spp, включая *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., включая *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., включая *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., включая *C. tetani* (например, столбнячный токсин и его производное), *C. botulinum* (например, ботулинический токсин и его производное), *C. difficile* (например, токсины клостридий A или B и их производные); *Bacillus* spp., включая *B. Anthracis* (например, ботулинический токсин и его производные); *Corynebacterium* spp., включая *C. diphtheriae* (например, дифтерийный токсин и его производные); *Borrelia* spp., включая *B. burgdorferi* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. Garinii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., включая *E. equi* и агент гранулоцитарного эрлихиоза человека; *Rickettsia* spp, включая *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp. включая *C. trachomatis* (например, МОМР, гепарин-связывающие белки), *C. pneumoniae* (например, МОМР, гепарин-связывающие белки), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., включая *L. interrogans*; *Treponema* spp., включая *T. pallidum* (например редкие белки наружной мембраны), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; или другие бактериальные патогены.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем описании (например, термостабильная лиофилизированная вакцинная композиция), содержат антиген или антигенную композицию, способную индуцировать иммунный ответ против патогена человека или другого млекопитающего, причем антиген или антигенная композиция могут включать композицию, происходящую из одного или нескольких паразитов (см., например, John, D.T., Petri, W.A., Markell and Voge's Medical Parasitology - 9th ed., 2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., Georgis' Parasitology for Veterinarians - 8th ed., 2002, WB Saunders, Philadelphia), таких как *Plasmodium* spp., включая *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., включая *T. gondii* (например, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp., включая *E. histolytica*; *Babesia* spp., включая *B. microti*; *Trypanosoma* spp., включая *T. cruzi*; *Giardia* spp., включая *G. lamblia*; *Leshmania* spp., включая *L. major*; *Pneumocystis* spp., включая *P. carinii*; *Trichomonas* spp., включая *T. vaginalis*; или из гельминта, способного инфицировать млекопитающее, такого как (i) инфекции нематодами (включая, но не ограничиваясь ими, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Dracanculus medinensis*, *Trichinella spiralis* и *Strongyloides stercoralis*); (ii) инфекции трематодами (включая, но не ограничиваясь ими, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Opisthorchis sinensis*, *Paragonimus* sp, *Fasciola hepatica*, *Fasciola magna*, *Fasciola gigantica*); и (iii) инфекции цестодами (включая, но не ограничиваясь ими, *Taenia saginata* и *Taenia solium*). Определенные варианты осуществления, таким образом, могут предусматривать вакцинные композиции, которые включают антиген, происходящий из *Schistosoma* spp., *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* и/или *Schistosoma japonicum*, или происходящий из дрожжей, таких как *Candida* spp., включая *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., включая *C. neoformans*.

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит по меньшей мере два гетерологичных полипептида вида *Mycobacterium* туберкулезного комплекса. Вид *Mycobacterium* туберкулезного комплекса включает виды, традиционно считающиеся вызывающими заболевание туберкулез, а также *Mycobacterium environmental* и оппортунистические виды, которые вызывают туберкулез, а также заболевание легких у пациентов с иммунодефицитом, таких как пациенты со СПИД, например, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), *Mycobacterium bovis* или *Mycobacterium africanum*,

BCG, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium fortuitum* и *Mycobacterium scrofulaceum* (см., например, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, volume 1, p. 1004-1014 и 1019-1020). Последовательности антигенов из видов *Mycobacterium* являются общедоступными. Например, последовательности *Mycobacterium tuberculosis* могут быть найдены в Cole et al., *Nature*, 393:537 (1998) и могут быть найдены на сайтах в Интернете, таких как сайты, поддерживаемые Wellcome Trust, Sanger Institute и Institut Pasteur.

Другие конкретные антигены *M. tuberculosis*, которые можно использовать в композиции, описанной в настоящем описании, представляют собой, например, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 и hTCC1 (WO 99/51748). Белки *M. tuberculosis* также включают слитые белки и их варианты, где по меньшей мере два, предпочтительно три полипептида *M. tuberculosis* являются слитыми в более крупный белок. В некоторых вариантах осуществления слитые белки включают Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14DPV-MTI-MSL-mTTC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTTC2, TbH9-DPV-MTI (WO 99151748). Другие антигены, которые можно использовать, включают антигены, комбинацию антигенов и слитые белки, описанные US 2010/0129391 и WO 2008/124647.

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит выделенный слитый белок, содержащий комбинацию двух или более ковалентно связанных антигенов *M. tuberculosis* или их иммуногенных фрагментов, где антигены выбраны из группы, состоящей из Rv0164, Rv0496, Rv2608, Rv3020, Rv3478, Rv3619, Rv3620, Rv1738, Rv1813, Rv3810, Rv2389, Rv2866, Rv3876, Rv0054, Rv0410, Rv0655, Rv0831, Rv1009, Rv1099, Rv1240, Rv1288, Rv1410, Rv1569, Rv1789, Rv1818, Rv1860, Rv1886, Rv1908, Rv2220, Rv2032, Rv2623, Rv2875, Rv3044, Rv3310, Rv3881, Rv0577, Rv1626, Rv0733, Rv2520, Rv1253, Rv1980, Rv3628, Rv1884, Rv3872, Rv3873, Rv1511 и Rv3875, и антигенов, обладающих по меньшей мере 90% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит слитый белок ID93, который содержит антигены Rv2608, Rv3619, Rv3620 и Rv1813 или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с комбинацией антигенов. В другом варианте осуществления композиция содержит слитый белок ID93, который содержит антигены Rv2608, Rv3619, Rv3620 и Rv1813, где последовательности антигенов происходят из *M. tuberculosis*. В другом варианте осуществления слитый белок ID93 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с ней. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с ней. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая вакцина содержит слитый белок, содержащий комбинацию антигенов *Mycobacterium Rv2608*, *Rv3620* и *Rv1813*, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с комбинацией антигенов. В некоторых вариантах осуществления антигены *Mycobacterium Rv2608*, *Rv3620* и *Rv1813* представляют собой антигены Rv2608, Rv3620 и Rv1813 *M. tuberculosis*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3 или 4, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антиген Rv1813 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антиген Rv3620 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антиген Rv2608 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антиген Rv3619 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Специалисту в данной области будет понятно, что одна или несколько N-концевых аминокислот (таких как сигнальные последовательности) могут быть удалены. Эти последовательности описаны в US 8486414, который включен в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит слитый белок ID93, или полинуклеотид, кодирующий его, который содержит четыре антигена, принадлежащих семействам белков Mtb, ассоциированных с вирулентностью (Rv2608, Rv3619, Rv3620) или латентностью (Rv1813), как описано в публикации патентной заявки США № 2010/0129391 (прямо включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит антиген *Chlamydia*. Антигены *Chlamydia* включают, например, высокомолекулярный белок (HWP) (WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412), и предполагаемые мембранные белки (Pmps). Другие антигены *Chlamydia* композиции могут быть выбраны из группы, описанной в WO 99128475. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит антигены, происходящие из *Streptococcus spp*, включая *S. pneumoniae* (например, капсульные полисахариды и их конъюгаты, PsaA, PspA, стрептолизин, холин-связывающие белки) и белковый антиген пневмолизин (*Biochem Biophys Acta*, 1989, 67, 1007; Rubins et al., *Microbial Pathogenesis*, 25, 337-342), и его мутантные детоксицированные производные (WO 90/06951; WO 99/03884). Другие бактериальные антигены происходят из *Haemophilus spp.*, включая *H. influenzae* типа B (например, PRP и его конъюгаты), нетипируемые *H. influen-*

зае, например OMP26, высокомолекулярные адгезины, P5, P6, белок D и липопротейн D, фимбрин и происходящие из фимбрина пептиды (патент США № 5843464) или их многокопийные варианты или слитые белки.

Производные поверхностного антигена гепатита.

В хорошо известны в данной области и включают, среди прочих, антигены PreS1, Pars2 S, описанные в патентных заявках EP-A414 374; EP-A-0304 578; и EP 198474. В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит антиген ВИЧ-1, gp120, особенно при экспрессии в клетках СНО. В следующем варианте осуществления композиция содержит gD2t, как определено в настоящем описании выше.

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем описании, содержит антиген, происходящий из вируса папилломы человека (HPV), считающийся ответственным за остроконечные кондиломы (HPV 6 или HPV 11 и другие), и вирусов HPV, ответственных за рак шейки матки (HPV16, HPV18 и другие). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой профилактическую или терапевтическую вакцину против остроконечных кондилом, содержащую частицы L1 или капсомеры, и слитые белки, содержащие один или несколько антигенов, выбранных из белков E6, E7, L1 и L2 HPV 6 и HPV 11. Некоторые формы слитого белка включают L2E7, как описано в WO 96/26277, и белок D(1/3)-E7, описанный в GB 971795.5 (PCT/EP 98/05285). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой профилактическую или терапевтическую вакцину против инфекции HPV или злокачественной опухоли шейки матки, содержащую антигены HPV 16 или 18, например мономеры антигенов L1 или L2, или антигены L1 или L2, презентруемые вместе с вирусоподобной частицей (VLP), или белок L1 отдельно, презентруемый в VLP или капсомерной структуре. Такие антигены, вирусоподобные частицы и капсомер, по существу известны. См., например, WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792 и WO 93/02184.

Дополнительные ранние белки могут быть включены отдельно или в качестве слитых белков, например, таких как E7, E2 или предпочтительно F5; некоторые варианты осуществления включают VLP, содержащие слитые белки L1E7 (WO 96/11272). В некоторых вариантах осуществления антигены HPV 16 включают ранние белки E6 или F7 в слитой конструкции с носителем-белком D с получением слитых конструкций белок D-E6 или E7 из HPV 16 или их комбинации; или комбинации E6 или E7 с L2 (WO 96/26277). Альтернативно ранние белки E6 и E7 HPV 16 или 18 могут находиться в одной молекуле, предпочтительно слитой конструкции белок D-E6/E7. Такая композиция (например, термостабильная лиофилизированная вакцинная композиция) необязательно может содержать любой или оба белка E6 и E7 из HPV 18, предпочтительно в форме слитого белка: белок D-E6 или белок D-E7; или слитого белка: белок D E6/E7. Композиция по настоящему изобретению, кроме того, может содержать антигены из других штаммов HPV, предпочтительно из штаммов HPV 31 или 33.

Композиции по настоящему изобретению, кроме того, могут содержать антигены, происходящие из паразитов, которые вызывают малярию. Например, антигены из *Plasmodia falciparum* включают RTS.S и TRAP. RTS представляет собой гибридный белок, содержащий по существу всю C-концевую часть белка спорозоиота (CS) *P. falciparum*, связанного через четыре аминокислоты preS2-части поверхностного антигена гепатита В с поверхностным антигеном (S) вируса гепатита В. Его полная структура описана в международной патентной заявке № PCT/EP 92/02591, опубликованной в качестве WO 93/10152, по которой испрашивается приоритет патентной заявке Великобритании № 9124390.7. При экспрессии в дрожжах RTS продуцируется в качестве липопотеиновой частицы, и, когда он коэкспрессируется с S-антигеном из HBV, он образует смешанную частицу, известную как RTS.S.

Антигены TRAP описаны в международной патентной заявке № PCT/GB 89/00895, опубликованной в качестве WO 90/01496. Вариантом осуществления настоящего изобретения является вакцина против малярии, в которой антигенный препарат содержит комбинацию антигенов RTS.S и TRAP. Другие антигены плазмодия, которые, вероятно, являются кандидатами в компоненты многоступенчатой вакцины против малярии, представляют собой MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, секвестрин, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 *P. falciparum* и их аналоги в *Plasmodium* spp.

Некоторые описанные в настоящем описании варианты осуществления относятся к антигену, который происходит по меньшей мере из одного инфекционного патогена, такого как бактерия, вирус или грибок, включая *Actinobacterium*, такие как *M. tuberculosis* или *M. leprae* или другую микобактерию; бактерия, такая как представитель рода *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia* или *Bordetella*; вирус, такой как вирус простого герпеса, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус кошачьего иммунодефицита (FIV), цитомегаловирус, вирус *Varicella Zoster*, вирус гепатита, вирус Эпштейна-Барр (EBV), респираторно-синцитиальный вирус, вирус папилломы человека (HPV) и цитомегаловирус; ВИЧ, такой как ВИЧ-1 или ВИЧ-2; грибок, такой как *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* и *Pneumocystis* или дрожжи, включая виды *Candida*, такие как *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis* и *C. parapsilosis*; паразит, такой как простейшее, например, виды *Plasmodium*, включая *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* и *P. ovale*; или другой паразит, такой как один или несколько из *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Angiostrongylus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Cryptosporidium*,

Ancylostoma, Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Entamoeba dispar, Entamoeba hartmanni, Entamoeba polecki, Wuchereria bancrofti, Giardia и Leishmania.

Например, в вариантах осуществления композиций, содержащих антигены, происходящие из *Wogelia* sp., антигены могут включать нуклеиновую кислоту, происходящий из патогена антиген или антигенные препараты, рекомбинантно продуцированный белок или пептиды и химерные слитые белки. Одним таким антигеном является OspA. OspA может представлять собой полноразмерный зрелый белок в липидированной форме вследствие его биосинтеза в клетке-хозяине (Lipo-OspA) или альтернативно может представлять собой нелипидированное производное. Такие нелипидированные производные включают нелипидированный слитый белок NS1-OspA, который имеет первые 81 N-концевые аминокислоты неструктурного белка (NS1) вируса гриппа, и полный белок OspA, а другой, MDP-OspA, представляет собой нелипидированную форму OspA, содержащую 3 дополнительных N-концевых аминокислоты.

В данной области известны композиции и способы для идентификации индивидуумов, имеющих или предположительно имеющих риск наличия инфекции инфекционным патогеном, как описано в настоящем описании.

Например, бактерии *Mycobacterium tuberculosis* вызывают туберкулез (ТБ). Бактерии обычно атакуют легкие, однако также могут атаковать почку, спинной мозг и головной мозг. Без надлежащего лечения заболевание ТБ может быть летальным. Заболевание распространяется от одного индивидуума другому через воздух, когда инфицированный индивидуум чихает или кашляет. В 2003 году в США было описано более 14000 случаев ТБ.

Хотя туберкулез, как правило, можно контролировать с использованием длительной терапии антибиотиками, такое лечение не является достаточным для предупреждения распространения заболевания, и существуют опасения, касающиеся потенциального выбора устойчивых к антибиотикам штаммов. Инфицированные индивидуумы могут не иметь симптомы, но могут быть заразными в течение некоторого времени. Кроме того, хотя соблюдение режима лечения является ключевым, мониторинг поведения пациента проводить трудно. Некоторые пациенты не завершают курс лечения, что может приводить к неэффективному лечению и развитию устойчивости к лекарственному средству (например, патент США 7087713).

В настоящее время вакцинация живыми бактериями является наиболее эффективным способом индукции защитного иммунитета против туберкулеза. Наиболее распространенными *Mycobacterium*, используемыми для этой цели, являются бациллы Кальметта-Герена (BCG), авирулентный штамм *Mycobacterium bovis*. Однако безопасность и эффективность BCG является источником разногласий и в некоторых странах, таких как США, широкую общественность не вакцинируют. Диагноз обычно ставят с использованием кожного теста, который вовлекает внутрикожное воздействие туберкулина PPD (очищенное производное белка). Антигенспецифические Т-клеточные ответы приводят к поддающемуся измерению уплотнению в области инъекции через 48-72 ч после инъекции, которое указывает на воздействие антигенов *Mycobacterium*. Однако этот тест имеет проблемы с чувствительностью и специфичностью, и индивидуумы, вакцинированные BCG, не могут быть отличены от инфицированных индивидуумов (например, Патент США 7087713).

Хотя было показано, что макрофаги выступают в качестве основных эффекторов иммунитета против *M. tuberculosis*, Т-клетки являются основными индукторами такого иммунитета. Неотъемлемая роль Т-клеток в защите против инфекции *M. tuberculosis* иллюстрируется частой встречаемостью *M. tuberculosis* у пациентов со СПИД вследствие истощения CD4 Т-клеток, ассоциированных с инфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Было показано, что реагирующие с *Mycobacterium* CD4 Т-клетки являются мощными продуцентами гамма-интерферона (IFN-гамма), который, как в свою очередь было показано, запускает антимикобактериальные эффекты макрофагов у мышей. Хотя роль IFN-гамма у человека менее ясна, исследование показало, что 1,25-дигидроксивитамин D3 либо отдельно, либо в комбинации с IFN-гамма или фактором некроза опухоли-альфа, активирует макрофаги человека, ингибируя инфекцию *M. tuberculosis*. Более того, известно, что IFN-гамма стимулирует макрофаги человека к продукции 1,25-дигидроксивитамина D3. Аналогично было показано, что IL-12 играет роль в стимуляции устойчивости к инфекции *M. tuberculosis*. Для обзора иммунологии инфекции *M. tuberculosis* см. Chan and Kaufmann, *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, Bloom (ed.), ASM Press. Washington, D.C. (1994).

Существующие соединения и способы диагностики туберкулеза или индукции защитного иммунитета против туберкулеза включают применение полипептидов, которые содержат по меньшей мере одну иммуногенную часть одного или нескольких белков *Mycobacterium* и молекул ДНК, кодирующих такие полипептиды. Для обнаружения инфекции *Mycobacterium* у пациентов и в биологических образцах можно использовать диагностические наборы, содержащие такие полипептиды или последовательности ДНК и подходящий реагент для обнаружения. Также предусматриваются антитела, направленные против таких полипептидов. Кроме того, такие соединения можно составлять в композиции, описанные в настоящем описании, для иммунизации против инфекции *Mycobacterium* (патенты США № 6949246 и 6555653).

Малярию устранили во многих частях мира в 1960-е годы, однако заболевание все еще сохраняется и появляются новые штаммы заболевания, которые являются устойчивыми к существующим лекарст-

венным средствам. Малярия является значительной проблемой здравоохранения более чем в 90 странах. Девять из десяти случаев возникают в странах Африки южнее Сахары. Более одной трети мировой популяции находятся в состоянии риска, и от 350 до 500 млн человек инфицируются малярией каждый год. Сорок 5 млн беременных женщин имеют риск контакта с малярией в этом году. Из уже инфицированных индивидуумов более одного 1 млн индивидуумов погибают каждый год от того, что является предотвратимым заболеванием. Большинство этих смертей происходят у детей в Африке.

Малярия обычно передается, когда индивидуума кусает инфицированная самка комаров *Anopheles*. Для передачи комар должен быть инфицированным посредством извлечения крови из индивидуума, который уже инфицирован малярией. Малярия вызывается паразитом и клинические симптомы заболевания включают лихорадку и гриппоподобное заболевание, такое как озноб, головная боль, мышечные боли и усталость. Эти симптомы могут сопровождаться тошнотой, рвотой и диареей. Малярия также может вызывать анемию и желтуху вследствие потери эритроцитов. Инфекция одним типом малярии, *Plasmodium falciparum*, если не лечить надлежащим образом, может вызывать почечную недостаточность, припадки, спутанность сознания, кому и смерть.

Известен способ диагностики малярии *in vitro* у индивидуума, включающий приведение ткани или биологической жидкости, взятой от индивидуума, в контакт с молекулой или полипептидной композицией, где указанная молекула или полипептидная композиция содержит одну или несколько пептидных последовательностей, содержащих целые или часть одного или нескольких Т-эпитопов белков, являющихся результатом инфекционной активности *P. falciparum*, в условиях, позволяющих протекание иммунологической реакции *in vitro* между указанной композицией и антителами, которые могут присутствовать в ткани или биологической жидкости, и обнаружение *in vitro* образовавшихся комплексов антиген-антитело (см., например, патент США 7087231).

Была описана экспрессия и очистка рекомбинантного эктодомена AMA-1 *Plasmodium falciparum* (3D7). В предшествующих способах был получен высокоочищенный белок, который сохраняет укладку и дисульфидные мостики нативной молекулы. Рекомбинантный AMA-1 является пригодным в качестве диагностического реагента, а также для продуцирования антител и в качестве белка для применения отдельно или в качестве части вакцины для предупреждения малярии (патент США 7029685).

В данной области описаны полинуклеотиды, которые кодируют видоспецифические малярийные пептидные антигены *P. vivax*, которые представляют собой белки или фрагменты белков, секретируемых в плазму предрасположенного хозяина-млекопитающего после инфекции, также как моноклональные или поликлональные антитела, направленные против этих антигенов. Пептидные антигены, моноклональные антитела и/или поликлональный антитела используют в анализах, используемых для диагностики малярии, а также для определения того, является ли *Plasmodium vivax* видом, ответственным за инфекцию (патент США 6706872). Также описаны видоспецифические малярийные пептидные антигены *P. vivax*, которые представляют собой белки или фрагменты белков, секретируемых в плазму предрасположенного хозяина-млекопитающего после инфекции, также как и моноклональные или поликлональные антитела, направленные против этих антигенов. Пептидные антигены, моноклональные антитела и/или поликлональные антитела используют в анализах, используемых для диагностики малярии, а также для определения того, являются ли *Plasmodium vivax* видом, ответственным за инфекцию (см., например, патент США 6231861).

Рекомбинантный эктодомен AMA-1 *Plasmodium falciparum* (3D7) также экспрессировали способом, в котором продуцируется высокоочищенный белок, который сохраняет укладку и дисульфидные мостики нативной молекулы. Рекомбинантный AMA-1 является пригодным в качестве диагностического реагента для применения для продукции антител и в качестве вакцины (патент США 7060276). Аналогично известна экспрессия и очистка рекомбинантного MSP-1₄₂ *Plasmodium falciparum* (3D7), который сохраняет укладку и дисульфидные мостики нативной молекулы. Рекомбинантный MSP-1₄₂ является пригодным в качестве диагностического реагента для применения для продукции антител и в качестве вакцины (патент США 6855322).

Диагностические способы для обнаружения малярийных инфекций у человека для идентификации индивидуума, имеющего или предположительно имеющего риск наличия инфекции инфекционным патогеном малярии, таким образом, известны в соответствии с этими и сходными источниками литературы. В частности, например, образцы крови объединяют с реагентом, содержащим 3-ацетилпиридинадениндинуклеотид (APAD), субстрат (например, лактат или молочная кислота) и буфер. Реагент предназначен для обнаружения присутствия уникального гликолитического фермента, продуцируемого малярийным паразитом. Этот фермент известен как паразитическая дегидрогеназа молочной кислоты (PLDH). С использованием описанного выше реагента PLDH легко отличить от LDH хозяина. Объединение реагента с образцом зараженной паразитом крови приводит к уменьшению APAD. Однако уровень APAD не снижается посредством LDH хозяина. Затем снижение уровня APAD можно обнаружить различными способами, включая спектральные, флуориметрические, электрофоретические или колориметрические анализы. Обнаружение сниженного уровня APAD указанным выше образом обеспечивает положительный результат в отношении наличия малярийной инфекции (например, патент США 5124141). В другой методологии для диагностики малярии полипептид, содержащий характерную

аминокислотную последовательность, происходящую из антигена GLURP *Plasmodium falciparum*, распознается в исследуемом образце специфическим антителом, индуцированным против или реактивным в отношении полипептида (патент США 5231168).

Лейшманиоз является широко распространенным паразитарным заболеванием с частыми эпидемиями в Индостане, Африке и Латинской Америке, и разработка вакцины против него является приоритетной для Всемирной организации здравоохранения. Являясь причиной комплекса различных заболеваний, паразиты *Leishmania* вызывают летальные инфекции внутренних органов, а также тяжелое заболевание кожи. Одной из наиболее истощающих форм лейшманиоза является обезображивающая инфекция носа и рта. Количество случаев лейшманиоза растет, и в настоящее время он вышел из-под контроля во многих областях. Заболеваемость лейшманиозом также растет в некоторых развитых странах, в частности в южной Европе в результате ВИЧ-инфекции. Доступные лекарственные средства являются токсичными, дорогостоящими и требуют длительных ежедневных инъекций.

Leishmania являются простейшими паразитами, которые заселяют макрофаги или лейкоциты иммунной системы. Паразиты передаются через укусы мелких кровососущих насекомых (мошки), которые трудно контролировать, поскольку они населяют обширные области планеты.

Висцеральный лейшманиоз является наиболее опасным из трех проявлений заболевания. Согласно оценке, приблизительно 500000 новых случаев висцеральной формы (кала-азар или "the killing disease") возникают каждый год. Более 200 млн человек в настоящее время имеют риск приобретения висцерального лейшманиоза. Более 90% случаев висцерального лейшманиоза возникают в Индии, Бангладеш, Судане, Бразилии и Непале. Большинство смертей происходят у детей. Люди с кожной формой часто навсегда остаются обезображенными.

Инфекции *Leishmania* трудно диагностировать и, как правило, диагностика вовлекает гистопатологический анализ биоптатов тканей. Однако было разработано несколько серологических и иммунологических диагностических анализов (патент США 7008774; Senaldi et al. (1996), *J. Immunol. Methods*, 193:9-5; Zijlstra, et al. (1997), *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91:671-673; Badaro et al., (1996), *J. Inf. Dis.*, 173:758-761; Choudhary, S. et al. (1992), *J. Comm. Dis.*, 24:32-36; Badaro, R. et al. (1986), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35:72-78; Choudhary, A. et al. (1990), *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84:363-366; и Reed, S.G. et al. (1990), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43:632-639). Промастиготы высвобождают метаболические продукты в культуральную среду с образованием кондиционированной среды. Эти продукты метаболизма являются иммуногенными для хозяина. См. Schnur, L.F. et al. (1972), *Isrl. J. Med. Sci.*, 8:932-942; Sergeiev, V.P. et al. (1969), *Med. Parasitol.*, 38:208-212; El-On, J. et al. (1979), *Exper. Parasitol.*, 47:254-269; и Bray, R.S. et al. (1966), *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60:605-609; патент США № 6846648, патент США 5912166; патент США 5719263; патент США 5411865).

В некоторых вариантах осуществления антигеном является антиген *Leishmania*, описанный в US 2009/0041798, US 2009/0291099, US 8410258, US 8231881 и WO 2012/064659, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой слитый полипептид, содержащий по меньшей мере полипептидную последовательность стерин-24-с-метилтрансферазы (SMT) *Leishmania* и полипептидную последовательность неспецифической нуклеозидгидролазы (NH) *Leishmania*. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность NH *Leishmania* содержит по меньшей мере иммуногенную часть последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью NH *Leishmania* из *L. donovani*, *L. infantum* и *L. major*. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность NH *Leishmania* содержит по меньшей мере иммуногенную часть последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3 и 5, или последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью с ними. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность SMT *Leishmania* содержит по меньшей мере иммуногенную часть последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью с последовательностью SMT *Leishmania* из *L. donovani*, *L. infantum* и *L. major*. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность SMT *Leishmania* содержит по меньшей мере иммуногенную часть последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9 и 11, или последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью с ней. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, или последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью с ней. Последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13 представлены в WO 2012/064659 и US 20120114688, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Приблизительно 40 млн человек по всему миру инфицированы ВИЧ - вирусом, который вызывает СПИД.

Приблизительно 3 млн человек умирает от этого заболевания каждый год, 95% из которых в развивающихся странах. Каждый год практически 5 млн становятся ВИЧ-инфицированными. В настоящее время, расположенные к югу от Сахары страны Африки имеют наиболее высокую заболеваемость, однако он быстро распространяется в другие страны, такие как Индия, Китай и Россия. Эпидемия растет наиболее быстро среди национальных меньшинств. В США с 1981 года описано более 950000 случаев СПИД. СПИД поражает людей в течение их наиболее продуктивных лет. Женщины, как по биологиче-

ским, так и по социальным, причинам имеют увеличенный риск ВИЧ/СПИД.

СПИД вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который уничтожает и повреждает клетки иммунной системы организма и постепенно нарушает способность организма к борьбе с инфекциями и определенными злокачественными опухолями. ВИЧ наиболее часто распространяется вследствие незащищенного полового контакта с инфицированным партнером. Наиболее надежным решением проблемы является предупреждение распространения вируса. Одним из способов достижения этой цели является изготовление безопасной, эффективной и доступной вакцины против ВИЧ. Во всем мире менее одного из пяти человек с высоким риском ВИЧ-инфекции имеют доступ к эффективной профилактике.

Способы диагностики ВИЧ-инфекций известны, включая культивирование вируса, ПЦР характерных последовательностей нуклеиновых кислот из образцов от пациентов, и антительные тесты на присутствие антител против ВИЧ в сыворотках пациентов (см., например, патенты США № 6979535, 6544728, 6316183, 6261762, 4743540).

Согласно определенным другим вариантам осуществления, как описано в настоящем описании, пригодные композиции и способы могут включать антиген, который происходит из злокачественной клетки, что может быть пригодным для иммунотерапевтического лечения злокачественных опухолей.

Например, может быть пригодна композиция с антигенами отторжения опухоли, как например, для злокачественных опухолей предстательной железы, молочной железы, ободочной и прямой кишки, легкого, поджелудочной железы, почки или для меланомы. Иллюстративные антигены злокачественной опухоли или происходящие из злокачественных клеток антигены включают MAGE 1, 3 и MAGE 4 или другие антигены MAGE, такие как антигены, описанные в WO 99/40188, PRAME, BAGE, Lage (также известный как NY Eos 1), SAGE и HAGE (WO 99/53061) или GAGE (Robbins and Kawakami, 1996 Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 & 1998); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p. 293. Эти неограничивающие примеры антигенов злокачественных опухолей экспрессируются в широком диапазоне типов опухоли, таких как меланома, карцинома легкого, саркома и карцинома мочевого пузыря. См., например, патент США № 6544518.

Другие опухолеспецифические антигены, пригодные для применения в композициях, описанных в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, опухолеспецифические или ассоциированные с опухолью ганглиозиды, такие как GM₂ и GM₃ или их конъюгаты с белками-переносчиками; или антиген для применения в вакцинной композиции GLA для индукции или усиления иммунного ответа на злокачественную опухоль может представлять собой собственный пептидный гормон, такой как полно-размерный рилизинг-фактор гондотропина (GnRH, WO 95/20600), короткий пептид из 10 аминокислот, пригодный для лечения многих злокачественных опухолей. В другом варианте осуществления используют антигены предстательной железы, такие как простатспецифический антиген (PSA), PAP, PSCA (например, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 95(4)1735-1740, 1998), PSMA или в предпочтительном варианте осуществления антиген, известный как простата (например, Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1999), 96:3114-3119; Ferguson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1999, 96, 3114-3119; WO 98/12302; патент США № 5955306; WO 98/20117; патенты США № 5840871 и 5786148; WO 00/04149. Другие простатспецифические антигены известны из WO 98/137418 и WO/004149. Другим является STEAP (PNAS, 96, 14523 14528 7-12, 1999).

Другие ассоциированные с опухолью антигены, пригодные в контексте настоящего изобретения, включают Plu-1 (J. Biol. Chem., 274(22)15633-15645, 1999), HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomon et al., Bioessays 199, 21:61-70, патент США № 5654140) и Criptin (патент США № 5981215). Кроме того, антигены, особенно значимые для вакцин для терапии злокачественной опухоли, также включают тирозиназу и сурвивин.

Описанные в настоящем описании варианты осуществления, относящиеся к композициям, содержащим антиген злокачественной опухоли, могут быть пригодными против любой злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией ассоциированного с опухолью антигена, такой как экспрессия HER-2/neu или других специфических для злокачественной опухоли и ассоциированных со злокачественной опухолью антигенов.

Диагностику злокачественной опухоли у индивидуума, имеющего или предположительно имеющего риск злокачественной опухоли, можно проводить любым из широкого диапазона признанных в данной области методологий, которые могут варьироваться в зависимости от множества факторов, включая клинические проявления, степень прогрессирования злокачественной опухоли, тип злокачественной опухоли и другие факторы. Примеры способов диагностики злокачественной опухоли включают гистопатологическое, гистохимическое, иммуногистохимическое и иммуногистопатологическое исследование образцов пациента (например, кровь, биоптат кожи, биоптат другой ткани, хирургические образцы и т.д.), тесты ПЦР для определенных генетических (например, нуклеиновая кислота) маркеров, серологические тесты на циркулирующие ассоциированные со злокачественной опухолью антигены или клетки, содержащие такие антигены, или антитела определенной специфичности, или другие методологии, которые известны специалистам в данной области. См., например, патенты США № 6734172; 6770445; 6893820; 6979730; 7060802; 7030232; 6933123; 6682901; 6587792; 6512102; 7078180; 7070931; JP5-328975; Was-

lylyk et al., 1993, Eur. J. Bioch., 211(7):18.

Композиции и способы согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения также можно использовать для профилактики или терапии аутоиммунных заболеваний, которые включают заболевания, состояния или нарушения, где иммунная система хозяина или индивидуума опосредует вредоносный иммунный ответ, который направлен против "собственных" тканей, клеток, биомолекул (например, пептиды, полипептиды, белки, гликопротеины, липопротеины, протеолипиды, липиды, гликолипиды, нуклеиновые кислоты, такие как РНК и ДНК, олигосахариды, полисахариды, протеогликаны, гликозаминогликаны и т.п. и другие молекулярные компоненты клеток и тканей индивидуумов) или эпитопы (например, специфические иммунологически определенные распознаваемые структуры, такие как структуры, распознаваемые определяющей комплементарностью областью (CDR) варибельной области антитела или CDR T-клеточного рецептора).

Аутоиммунные заболевания, таким образом, характеризуются аномальным иммунным ответом, вовлекающим либо клетки, либо антитела, которые в любом случае направлены против нормальных аутологических тканей. Аутоиммунные заболевания у млекопитающих, как правило, могут быть отнесены к одной из двух различных категорий: клеточно-опосредуемое заболевание (т.е. T-клеточное) или антитело-опосредуемые нарушения. Неограничивающие примеры клеточно-опосредуемых аутоиммунных заболеваний включают рассеянный склероз, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет типа I (диабет с ювенильным началом) и аутоиммунный увеит. Антитело-опосредуемые аутоиммунные нарушения включают, но не ограничиваются ими, миастению, системную красную волчанку (или SLE), болезнь Грэйвса, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунную тромбоцитопению, аутоиммунную астму, криоглобулинемию, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, первичный билиарный склероз и пернициозную анемию. Антиген(ы), ассоциированный(ые) с системной красной волчанкой, представляет(ют) собой малые ядерные рибонуклеопротеины (snRNP); антиген(ы), ассоциированный(ые) с болезнью Грэйвса, представляет(ют) собой рецептор тиротропина, тиреоглобулин и другие компоненты эпителиальных клеток щитовидной железы (Akamizu et al., 1996; Kellerman et al., 1995; Raju et al., 1997; и Texier et al., 1992); антиген(ы), ассоциированный(ые) с пемфигусом, представляет(ют) собой кадгеринподобные антигены пемфигуса, такие как десмоглеин 3 и другие молекулы адгезии (Mearns et al., 1996; Stanley, 1995; Plott et al., 1994; и Hashimoto, 1993); и антиген(ы), ассоциированный(ые) с тромботической тромбоцитопенической пурпурой, представляет(ют) собой антигены тромбоцитов (см., например, патент США 6929796; Gorski et al. (Eds.), *Autoimmunity*, 2001, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA; Radbruch and Lipsky, P.E. (Eds.) *Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation* (Curr. Top. Microbiol. and Immunol.) 2001, Springer, NY).

Аутоиммунитет играет роль более чем в 80 различных заболеваниях, включая диабет I типа, рассеянный склероз, волчанку, ревматоидный артрит, склеродермию и заболевания щитовидной железы. Надежные способы количественной оценки клинических проявлений большинства аутоиммунных заболеваний отсутствуют. Большинство последних исследований, проведенных в поздние 1990 годы, выявили, что аутоиммунные заболевания являются третьими из наиболее распространенных заболеваний в США; и наиболее распространенными аутоиммунными заболеваниями страдают более 8,5 млн американцев. Согласно современной оценке, распространенность заболеваний находится в диапазоне от 5 до 8% популяции США. Большинство аутоиммунных заболеваний непропорционально поражают женщин. Женщины имеют в 2,7 раз более высокую вероятность заболеть аутоиммунным заболеванием. Женщины являются более предрасположенными к аутоиммунным заболеваниям; мужчины, по-видимому, имеют более высокие уровни активности естественных киллеров, чем женщины (Jacobsen et al., *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84:223-243, 1997).

Аутоиммунные заболевания возникают, когда иммунная система неправильно принимает собственные ткани за несобственные и индуцирует ненадлежащую атаку. Организм может поражаться аутоиммунными заболеваниями различными путями, включая, например, кишечник (болезнь Крона) и головной мозг (рассеянный склероз). Известно, что аутоантитело атакует собственные клетки или собственные ткани, нарушая их функцию и в результате вызывает аутоиммунные заболевания, и что аутоантитело может быть обнаружено в сыворотке пациента до фактического возникновения аутоиммунного заболевания (например, появление клинических признаков и симптомов). Таким образом, обнаружение аутоантител позволяет ранее обнаружение или признание наличия риска развития аутоиммунного заболевания. Исходя из этих данных были открыты различные аутоантитела против аутоантигенов и аутоантитела против аутоантигенов измеряют в клинических тестах (например, патент США 6919210, 6596501, 7012134, 6919078), хотя другая диагностика аутоиммунных заболеваний может вовлекать обнаружение соответствующего метаболита (например, патент США № 4659659) или иммунологической реактивности (например, патенты США № 4614722 и 5147785, 4420558, 5298396, 5162990, 4420461, 4595654, 5846758, 6660487).

В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению особенно пригодны для лечения пожилых и/или иммунодефицитных индивидуумов, включая индивидуумов, подвергающихся диализу почек, индивидуумов, подвергающихся химиотерапии и/или лучевой терапии, реципиентов трансплантатов и т.п. Такие индивидуумы, как правило, проявляют ослабленный иммунный ответ на вакцины

и, таким образом, применение композиций по изобретению может усилить иммунные ответы, достигнутые у этих индивидуумов.

В других вариантах осуществления антиген или антигены, используемые в композициях по изобретению, включают антигены, ассоциированные с респираторными заболеваниями, такими как заболевания, вызываемые или усиливаемые бактериальной инфекцией (например, пневмококковые), для профилактики и терапии состояний, таких как хроническое обструктивное заболевание легких (COPD). COPD определяется физиологически присутствием необратимой или частично обратимой обструкции дыхательных путей у пациентов с хроническим бронхитом и/или эмфиземой (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995 Nov; 152(5 Pt. 2):S77-121). Обострение COPD часто вызывается бактериальной (например, пневмококковой) инфекцией (*Clin. Microbiol. Rev.*, 2001 Apr; 14(2):336-63).

Масла для применения в термостабильных композициях.

Некоторые варианты осуществления относятся к композициям, описанным в настоящем описании, которые включают масло, которое в некоторых вариантах осуществления может вносить вклад в адьювантную активность и в других вариантах осуществления дополнительно или альтернативно может представлять собой фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Любое количество подходящих масел известно и может быть выбрано для включения в композиции на основе настоящего изобретения. Примеры таких масел в качестве иллюстрации, но не ограничения включают сквален, синтетический сквален, минеральное масло, масло из семян винограда, синтетический изопреноид, оливковое масло, холестерин и маннид моноолеат.

Масло, используемое в рамках настоящего изобретения, можно использовать в эмульсионной системе, и такие эмульсионные системы называются эмульсионным адьювантом. Эмульсионные адьюванты включают смеси "масло в воде", "вода в масле" или "вода в масле в воде". Без связи с теорией такие эмульсионные адьюванты могут функционировать, осуществляя медленное высвобождение антигенов для обеспечения непрерывной стимуляции иммунной системы. Определенные эмульсионные адьюванты также можно использовать в качестве системы доставки для других адьювантов, включая иммуностимулирующие адьюванты, такие как, но не ограничиваясь ими, CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN), глюкопиранозиллипидный адьювант (GLA), монофосфориллипид А (MLA) и 3-деацелированный монофосфориллипид А (3D-MLA). Были описаны определенные эмульсионные системы для составления адьювантных композиций, включая однофазные и мультифазные эмульсионные системы. Было предположено, что адьюванты на основе эмульсии типа "масло в воде" сами по себе являются пригодными в качестве адьювантной композиции (EP 0399843B), также комбинации эмульсий типа "масло в воде" и других активных веществ были описаны в качестве адьювантов для вакцин (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Были описаны другие адьюванты на основе масляной эмульсии, такие как эмульсии типа "вода в масле" (патент США № 5422109; EP 0480982 B2) и эмульсии типа "вода в масле в воде" (патент США № 5424067; EP 0480981 B).

Адьюванты на основе масляной эмульсии для применения в рамках настоящего изобретения могут быть природными или синтетическими и могут быть минеральными или органическими. Примеры минеральных и органических масел будут очевидны специалисту в данной области. В конкретном варианте осуществления композиция по изобретению (например, термостабильная лиофилизированная вакцина) содержит эмульсию типа "масло в воде", где адьювант включен в масляную фазу. Чтобы композиция типа "масло в воде" была пригодной для введения человеку, масляная фаза эмульсионной системы предпочтительно содержит метаболизируемое масло. Значение термина "метаболизируемое масло" хорошо известно в данной области. "Метаболизируемый" может быть определен как "способный к трансформации посредством метаболизма" (*Dorland's illustrated Medical Dictionary*, W.B. Saunders Company, 25th edition (1974)). Масло может представлять собой любое растительное масло, овощное масло, рыбий жир, животное масло или синтетическое масло, которое является нетоксичным для реципиента и способно трансформироваться посредством метаболизма. Обычными источниками растительных масел являются орехи (как например, арахисовое масло), семена и зерна. Также можно использовать синтетические масла.

Сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен), например, представляет собой ненасыщенное масло, которое встречается в больших количествах в жире печени акулы и в более низких количествах в оливковом масле, масле ростков пшеницы, масле из рисовых отрубей и дрожжах, и он является особенно предпочтительным маслом для применения в рамках настоящего изобретения. Сквален представляет собой метаболизируемое масло ввиду того факта, что он является промежуточным соединением в биосинтезе холестерина (*Merck index*, 10th edition, entry № 8619). Иллюстративные метаболизируемые масла, пригодные согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, сквален, соевое масло, кунжутное масло и триглицериды каприловой/каприновой кислоты (MIGLYCOL 810 oil). В одном варианте осуществления метаболизируемое масло содержит сквален. В другом варианте осуществления метаболизируемое масло содержит один или несколько изопреноидов дрожжевого происхождения, таких как сквален дрожжевого происхождения или родственная изопреноидная структура, происходящая из дрожжей.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат метабо-

лизируемое масло, которое присутствует в концентрации приблизительно 0,01-5% об./об., приблизительно 0,01-4% об./об., приблизительно 0,01-3% об./об., приблизительно 0,01-2% об./об., приблизительно 0,01-1% об./об. или приблизительно 0,01-0,5% об./об. В некоторых вариантах осуществления метаболируемое масло присутствует в концентрации приблизительно 0,01% об./об., приблизительно 0,05% об./об., приблизительно 0,1% об./об., приблизительно 0,5% об./об., приблизительно 1% об./об., приблизительно 1,5% об./об., приблизительно 2% об./об., приблизительно 2,5% об./об., приблизительно 3% об./об., приблизительно 3,5% об./об., приблизительно 4% об./об., приблизительно 4,5% об./об., приблизительно 5% об./об., приблизительно 6% об./об., приблизительно 7% об./об., приблизительно 8% об./об., приблизительно 9% об./об., приблизительно 10% об./об., приблизительно 11% об./об., приблизительно 12% об./об., приблизительно 13% об./об., приблизительно 14% об./об., приблизительно 15% об./об., приблизительно 16% об./об., приблизительно 17% об./об., приблизительно 18% об./об., приблизительно 19% об./об. или приблизительно 20% об./об. В некоторых вариантах осуществления метаболируемое масло присутствует в концентрации приблизительно 2% об./об. В некоторых вариантах осуществления метаболируемое масло присутствует в концентрации ниже 1% об./об. Описанные проценты относятся к процентам либо в составе эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией, либо в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении.

Размер капель масла, находящихся в стабильной эмульсии типа "масло в воде", предпочтительно составляет менее 1 микрометра, и может находиться в диапазоне по существу 30-600 нм, предпочтительно по существу приблизительно 30-500 нм в диаметре и наиболее предпочтительно по существу 150-500 нм в диаметре и, в частности, приблизительно 150 нм в диаметре при измерении с использованием фотонно-корреляционной спектроскопии. В этом отношении 80% количества масляных капель должны находиться в предпочтительных диапазонах, более предпочтительно более 90% и наиболее предпочтительно более 95% количества масляных капель находятся в определенных диапазонах размеров.

Гидрофильно-липофильный баланс (HLB) эмульсии позволяет оценку гидрофильного или липофильного действия поверхностно-активного вещества. HLB амфифильной молекулы, как правило, вычисляют следующим образом:

$$HLB = (20 \times \text{масса гидрофильной части}) / (\text{масса амфифильной молекулы})$$

HLB может иметь величину в диапазоне от 0 (для наиболее липофильной молекулы) до 20 (для наиболее гидрофобной молекулы). Согласно химическому составу поверхностно-активного вещества (в частности, например, добавление этоксильных групп или оксидов алкенов) эта оценка может изменяться и интервал величины HLB может возрасти (например, LUTROL F68® имеет HLB 29). В случае смеси поверхностно-активных веществ HLB смеси представляет собой сумму HLB каждого поверхностно-активного вещества, уравновешенную ее весовым соотношением:

$$HLB = (HLB \text{ поверхностно-активного вещества } X \times \text{масса поверхностно-активного вещества } X) + (HLB \text{ поверхностно-активного вещества } Y \times \text{масса поверхностно-активного вещества } Y) / (\text{масса поверхностно-активного вещества } X + \text{масса поверхностно-активного вещества } Y)$$

В одном варианте осуществления эмульсии, полученной в соответствии с настоящим изобретением, конечный HLB эмульсии составляет от приблизительно 9 до приблизительно 12, предпочтительно от приблизительно 9,5 до приблизительно 11,5 и более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 11,5. В некоторых вариантах осуществления HLB эмульсии составляет от приблизительно 10,5 до приблизительно 11,0. Способ получения эмульсии типа "масло в воде" хорошо известен специалисту в данной области. Обычно способ включает смешение масляной фазы с подходящим поверхностно-активным веществом, таким как раствор PBS/TWEEN80®, а затем гомогенизацию с использованием гомогенизатора. Например, способ, который включает пропускание смеси один раз, два раза или более раз через иглу шприца, является пригодным для гомогенизации малых объемов жидкости. В равной степени процесс эмульгации в микрофлюидизаторе (устройство MHOS microfluidics machine, максимум 50 пропусков в течение 2 мин при входном максимальном давлении 6 бар (выходное давление приблизительно 850 бар)) может быть адаптирован для получения меньших или больших объемов эмульсии. Эта адаптация может быть осуществлена с использованием стандартного экспериментирования, включающего количественное определение конечного объема эмульсии до достижения препарата с каплями масла требуемого диаметра.

Применение фармацевтических термостабильных композиций.

В другом аспекте изобретение относится к способам стимуляции иммунного ответа у индивидуума, включающим введение восстановленной термостабильной вакцинной композиции, описанной в настоящем описании, индивидууму. Способ, кроме того, может включать стадию восстановления термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции в эмульсию типа "масло в воде" до введения.

Таким образом, настоящее изобретение является пригодным для усиления или индукции у хозяина,

пациента, или индивидуума, или в клеточной культуре иммунного ответа. Пациент может страдать инфекционным заболеванием, злокачественной опухолью, такой как рак молочной железы, или аутоиммунным заболеванием, или он может быть нормальным (т.е. свободным от поддающегося обнаружению заболевания и/или инфекции). "Клеточная культура" представляет собой любой препарат, содержащий иммунокомпетентные клетки или выделенные клетки иммунной системы (включая, но не ограничиваясь ими, Т-клетки, макрофаги, моноциты, В-клетки и дендритные клетки). Такие клетки можно выделять любым из различных способов, хорошо известных средним специалистам в данной области (например, центрифугирование в градиенте плотности Ficoll-hyраque). Клетки могут (но не должны) быть взятыми от пациента, страдающего злокачественной опухолью, и они могут быть обратно введены пациенту после обработки.

Пути введения.

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для вакцинации, лечения и профилактики состояний, таких как инфекционное заболевание, злокачественная опухоль или аутоиммунное заболевание. Способы по настоящему изобретению включают пути введения, которые включают парентеральное и непарентеральное введение. Непарентеральные пути введения включают, но не ограничиваются ими, пероральный, буккальный, сублингвальный, местный, чрескожный, глазной, ушной, назальный, ректальный и вагинальный пути. Инъекционные способы включают, но не ограничиваются ими, парентеральные пути введения, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрипозвоночный, интракакальный, интрацеребровентрикулярный, внутриартериальный и другие пути инъекции. Настоящее изобретение относится к композициям, которые могут обеспечить контролируемое, замедленное или непрерывное высвобождение антигена и/или адъюванта в течение заданного периода времени.

Составы.

Составы известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, составы, такие как таблетки, покрытые таблетки, жевательные таблетки, шипучие таблетки, гранулы, капсулы, сиропы, суппозитории, инъекционные составы и дисперсия активного вещества в среде, которая нерастворима в физиологических жидкостях или где высвобождение антигена и/или адъюванта происходит после дегградации состава вследствие механической, химической или ферментативной активности.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными составами, стадиями процесса и материалами, описанными в настоящем описании, поскольку такие составы, стадии процесса и материалы могут в некоторой степени варьироваться.

Наборы и фармацевтические упаковки.

Также в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к наборам, содержащим описанные в настоящем описании вакцинные композиции, которые могут находиться в одном или нескольких контейнерах. В одном варианте осуществления все компоненты вакцинных композиций присутствуют вместе в одном контейнере, однако варианты осуществления изобретения не ограничиваются этим и также возможны два или более контейнеров.

Контейнер согласно таким вариантам осуществления наборов может представлять собой любой подходящий контейнер, емкость, флакон, ампулу, пробирку, чашку, коробку, бутылку, колбу, банку, лоток, лунку однолуночного или многолуночного устройства, резервуар, бак и т.п. или другое устройство, в котором описанные композиции могут находиться, храниться и/или транспортироваться и к которым может быть осуществлен доступ для извлечения содержимого. Как правило, такой контейнер может быть изготовлен из материала, который является совместимым с предполагаемым применением и из которого может быть без труда осуществлено извлечение содержимого. Предпочтительные примеры таких контейнеров включают стеклянные и/или пластмассовые герметизированные или повторно герметизируемые пробирки и ампулы, включая пробирки и ампулы, имеющие резиновую пробку или другие средства герметизации, которые совместимы с извлечением содержимого с использованием иглы и шприца. Такие контейнеры, например, могут быть изготовлены из стекла или химически совместимой пластмассы или смолы, которые могут быть изготовлены из или могут быть покрыты материалом, который позволяет эффективное извлечение материала из контейнера и/или защищает материал, например, от деструктивных условий, таких как ультрафиолетовое излучение или чрезмерные температуры, или от попадания нежелательных примесей, включая микробные примеси. Контейнеры предпочтительно являются стерильными или поддающимися стерилизации и изготовлены из материалов, которые совместимы с любым носителем, эксципиентом, растворителем, наполнителем и т.п., такими как те, которые могут быть использованы для суспендирования или растворения описанных в настоящем описании вакцинных композиций и/или иммунологических адъювантных композиций, и/или антигенов, и/или рекомбинантных экспрессирующих конструкций и т.д.

Изобретение станет более понятным с помощью следующих примеров. Однако их не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем описании, предназначены только для целей иллюстрации. Различные варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать для получения дополнительных вариантов осуществления. Различные модификации или изменения ввиду этого станут очевидными специалистам в

данной области из представленного выше описания, и они являются частью сущности и сферы настоящей заявки, и входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Лиофилизированный состав вакцинной эмульсии и стабильность в системах с одним и с несколькими эксципиентами.

Была желательной лиофилизация стабильной эмульсии "масло в воде" (SE) для применения в вакцинах. Исследовали способность эксципиента образовывать термически стабильную лепешку привлекательного вида при лиофилизации и/или сохранять целостность эмульсии при восстановлении для разработки термически стабильных вакцинных систем, которые снижали или устраняли потребность в поддержании холодовой цепи при всех территориально значимых температурах.

Материалы и способы.

Составление и лиофилизация.

Содержащую сквален стабильную эмульсию (SE), описанную ранее (EM001; Fox et al., 2012, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, в печати), лиофилизировали в конечной концентрации сквалена 2,0% об./об. (разбавленный до заданной конечной инъецируемой концентрации из первоначального 10% состава) с общим объемом заполнения 1,0 мл. Концентрации эксципиента указаны в качестве процента по массе (% мас./об.) и концентрации эмульсии указаны в качестве процента по объему (% об./об.) масляной фазы сквалена. Мальтозу, D(-)-рибозу, D(-)-фруктозу, лактозу, полиэтиленгликоль (PEG; ММ 3350 Да), лактулозу, никотиновую кислоту, D(+)-рафинозы пентагидрат, 2,6-пиридиндикарбоновую кислоту и L-пролин приобретали от Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo). D(+)-маннит и D(+)-трегалозы дигидрат категории USP, сахарозу и лактозы моногидрат категории NF и декстран (ММ 40000 Да) приобретали от Spectrum Chemical (New Brunswick, NJ). D(+)-маннозу, стахиозы гидрат и декстрозы моногидрат категории USP приобретали от Thermo Scientific (Waltham, MA). Образцы составляли с использованием описанных выше эксципиентов в различных концентрациях при составлении в воде, которая была деионизированной и отфильтрованной через фильтрационную систему Barnstead/Thermolyne (Dubuque IA) E-Pure D4631, а затем через 20-нм фильтр Anotop plus от Whatman (Maidstone, Kent, Великобритания). Составы, приводящие к чрезмерным сдвигам pH (ниже 5,0 или выше 7,0), при восстановлении пересоставляли до pH 5,5 перед лиофилизацией с использованием NaCl и NaOH. Лиофилизацию проводили с использованием настольного лиофилизатора Advantage 2.0 EL-85 от VirTis (Gardiner, NY). Параметры лиофилизации включали схему термической обработки, включающей стадию замораживания в течение 10 ч от 4 до -40°C и стадию отжига при -15°C. Первичная фаза высушивания (при 100 мТорр) длилась 18,3 ч от -40 до 25°C. Наконец, вторичную фазу высушивания при 50 мТорр использовали при 25°C в течение 9 ч. Все образцы закупоривали в атмосферном газе при 500 мТорр, герметизировали с использованием алюминиевых крышек и хранили при 4°C до применения.

Восстановление.

Перед восстановлением лепешки визуально охарактеризовывали либо как белая лепешка привлекательного вида (что означает, что лепешка была белой приблизительно в том же объеме, что при заполнении, и на вид имела единообразную решетку), пленка или что-либо отличающееся от белой лепешки привлекательного вида. Все образцы восстанавливали с использованием воды, фильтрованной через 20-нм фильтр (описанной выше) и осторожно вращали рукой до тех пор, пока либо все компоненты не сольбилизировались, либо не проходило три минуты, в зависимости от того, что происходило первым. После восстановления составы описывали либо как молочно-белая эмульсия (выглядящая аналогично составу до лиофилизации), либо иным образом, отмечая любые отличия от молочно-белой эмульсии. Затем аликвотам каждого состава позволяли стоять в покое при комнатной температуре в течение 1 ч и визуально оценивали в отношении признаков густой белой фазы на поверхности, которую указывали как расслоение. Также исследовали pH каждого состава с использованием pH-метра MP225 от Mettler-Toledo (Columbus, OH). Определение температуры плавления Температуру плавления каждого лиофилизированного состава оценивали в трех экземплярах с использованием автоматизированной системы для определения температуры плавления Stanford Research Systems (Sunnyvale, CA) OptiMelt. Каждый капилляр для плавления погружали один раз в лепешку и набивали до тех пор, пока материал не оседал на дно. Плавление проводили при от 27 до 200°C (как правило, этот диапазон укорачивали после завершения плавления) со скоростью линейного изменения 1°C в мин.

Альтернативный способ измерения температуры плавления вовлекал применение визуализирующего устройства для определения температуры плавления. Флаконы с лиофилизированной SE с различными эксципиентами плавляли в трех экземплярах, как описано выше. Переход плавления наблюдали в качестве плавления непрозрачной лепешки в прозрачную жидкость, которая снижала интенсивность света образца на изображении. Точки начала визуального отмечали в качестве первого заметного уменьшения объема лепешки в начале перехода плавления (начало изменений лепешки непосредственно перед плавлением) и среднюю температуру плавления (T_m) лепешки определяли в качестве температуры, при которой лепешки утрачивали половину пиксельной интенсивности между полностью твердой и полностью расплавленной лепешкой. Аналогично температуры, при которых лепешка утрачивала 25 и 75% интенсивности (нормализованные к началу и концу перехода), вычисляли в качестве величины диапазона

плавления.

Определение влажности.

Содержание влаги в содержащих 5% трегалозу лиофилизированных лепешках охарактеризовывали с помощью титратора Coulometric Karl Fischer Titrator (Model 270) от Denver Instruments (Bohemia, NT) с использованием дублированных флаконов лиофилизированной SE (5% трегалоза 2% масляной SE) с последующими 2 независимыми лиофилизациями. Измерение с титрованием проводили при средней скорости перемешивания с конечным временем выдерживания 15 с и конечным наклоном 0,05. Образцы восстанавливали с использованием Riedel-de-Haens Hydranal AG Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) и взвешенный раствор инжестировали в титратор. После определения массы содержащейся воды с использованием устройства вычисляли процент воды в качестве % мас./мас.

Размер частиц и зета-потенциал.

Размер частиц эмульсии, полидисперсность (PdI) и зета-потенциал оценивали с использованием динамического рассеяния света (DLS) на Nano-ZS от Malvern (Worcestershire, Великобритания). Измерение проводили в основном как описано выше (Fox et al., 2011, Pharmaceutical Development and Technology, 16(5):511-519). В кратком изложении все измерения размера DLS проводили в разведениях 10^{-2} в фильтрованной через 20-нм фильтр воде (описанной выше) и единичные аликвоты оценивали в трех экземплярах. Для измерения зета-потенциала ту же аликвоту оценивали с использованием измерений в трех экземплярах и автоматического определения с использованием программного обеспечения длительности измерения между 20 и 40 прогонами.

Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Мониторинг химической деградации сквалена, DMPC и GLA проводили с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

Использовали Agilent 1200 (Santa Clara, CA) и ESA Biosciences Corona Charged Aerosol Detector (CAD; Chelmsford, MA) с C18-мкм колонкой Waters Atlantis (4,6×250 мм; Milford, MA). См. Fox et al., 2008, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 65:98-105. Подвижная фаза А содержала метанол:хлороформ:воду в соотношении 75:15:10 (об./об./об.) и 20 мМ ацетат аммония с 1% уксусной кислотой и подвижная фаза В содержала метанол:хлороформ в соотношении 50:50 (об./об.) с 20 мМ ацетатом аммония и 1% уксусной кислотой. Образцы приготавливали разведением восстановленных образцов 1:20 в подвижной фазе В. Использовали инжестирование 9 мкл с линейным градиентом от 100 до 10% подвижной фазы А в течение 45 мин и температуры колонки 30°C. Все использованные растворители представляли собой растворители категории ВЭЖХ.

Скрининг восстановления.

Составы, содержавшие 2% SE и каждый из 5% трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, рафинозы, маннозы, фруктозы, лактулозы, рибозы, декстрана, PEG, маннита, стахиозы, сорбита и пролина, получали, как описано в 3.1. Также получали составы с дипиколиновой кислотой и никотиновой кислотой, однако их составляли в концентрации 0,5% вследствие ограничений по растворимости. Каждый состав восстанавливали, как описано выше. Образцы охарактеризовывали в отношении внешнего вида лепешки, расслоения, размера частиц, зета-потенциала, PdI и pH, как описано выше.

Скрининг стабильности лепешки.

Температуру плавления подгруппы соединений в концентрации 5% оценивали, как описано выше. Эти соединения включали трегалозу, декстрозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маннозу, фруктозу, лактулозу, рафинозу, рибозу, стахиозу, маннит и пролин. В качестве исследования для наблюдения составы, содержавшие трегалозу, декстрозу, лактозу, мальтозу или сахарозу в концентрации 5%, получали с 0,2 или 5% маннитом и 2% SE. Эти составы оценивали в отношении плавления лепешки, расслоения, pH, PdI и размера частиц, как описано выше.

Ускоренная охарактеризация стабильности.

Флаконы с лиофилизированной SE в 5% трегалозе хранили при 25, 37, 50, 60 и 90°C и восстанавливали периодически на протяжении 1500 ч или до тех пор, пока не наблюдали полное разрушение. Образцы охарактеризовывали в отношении DLS, pH, ВЭЖХ и внешнего вида лепешки в каждый момент времени. Аналогично для сравнения охарактеризовывали не лиофилизированную SE. Составы, идентифицированные как имеющие высокие температуры плавления лепешки, выбирали для дополнительной ускоренной охарактеризации стабильности для разработки более стабильной системы. Составы включали 5% декстрозу, мальтозу, сахарозу и трегалозу. Также включали экспериментальный состав, содержавший 15% лактозу. Ускоренную оценку стабильности этих составов проводили, как описано выше, при 90°C для установления изменений во всех из этих составов.

Результаты.

Ллиофилизация SE в трегалозе.

Вследствие широкого применения трегалозы в лиофилизированных составах содержащий трегалозу состав оценивали для исследования осуществимости лиофилизации эмульсии.

После лиофилизации лепешки, содержавшие SE с 5% трегалозой и 2% об./об. скваленом, обеспечили несколько сморщенную белую лепешку с содержанием влаги 0,3% мас./мас. и хорошей растворимостью при восстановлении (фиг. 1А). Восстановленная эмульсия выглядела визуально сходной с не лио-

филизированным составом. При восстановлении наблюдали увеличение среднего размера частиц на 21 нм (фиг. 1B), а также увеличение PDI 0,02. Лиофилизация и восстановление не изменяли pH. Эти результаты обеспечили первоначальную оценку, состоящую в том, что эмульсия сохранялась после лиофилизации и восстановления.

Ускоренная характеристика стабильности SE в трегалозе.

После успешной лиофилизации и восстановления SE в трегалозе оценивали стабильность лиофилизированной SE для определения того, повышала ли лиофилизация стабильность эмульсии. Исходя из размера частиц (фиг. 2A) и pH (фиг. 2B) восстановленной лиофилизированной SE лиофилизированный состав был более стабильным, чем жидкий состав при 25 и 37°C. Не наблюдали значительных изменений химического состава для жидкой или восстановленной лиофилизированной SE при этих температурах. Лиофилизация также повышала химическую стабильность эмульсии при повышенных температурах, требуемых для индукции изменения композиции в жидком составе (фиг. 2C). В частности, все из α -токоферола, сквалена и фосфатидилхолина яичного происхождения (яичный PC) были защищены в лиофилизированном составе по сравнению с жидким составом. Кроме того, отдельная масляная фаза, которая может указывать на обезжиривание, не обнаруживалась. Таким образом, поскольку масло, по-видимому, не перераспределялось в этой системе или не входило в другую фазу, частицы сохранились в качестве эмульсии после восстановления.

Определение основного механизма неблагоприятного результата.

Для расширения стабильности лиофилизированной SE за пределы трегалозы проводили исследование для определения основного механизма неблагоприятного результата с целью выбора последующих составов, которые ингибируют этот механизм. Лиофилизированную SE хранили при диапазоне температур 25, 37, 50, 60 и 90°C в течение вплоть до 1500 ч или до тех пор, пока не происходило ухудшение составов до уровня, выходящего за пределы охарактеризации (фиг. 3). Лиофилизированная эмульсия была значительно менее стабильной при более чем 50°C. Первым наблюдаемым изменением было увеличение размера частиц, которое происходило одновременно (фиг. 3A и 3C) с обратным плавлением лепешки. Большие изменения pH начинали происходить, только когда частицы уже имели неприемлемый размер (фиг. 3B), и, таким образом, они не считались основным механизмом разрушения. Таким образом, поскольку концентрации компонентов эмульсии (фиг. 2C) и pH (фиг. 3B) не изменялись изначально, было предположено, что механизм не является ковалентным по происхождению. Однако обратное плавление лепешки прямо коррелировало с размером частиц с течением времени (фиг. 3D). Поскольку обратное плавление лепешки, по-видимому, происходило быстрее, чем увеличение размера частиц, устойчивость лепешки к обратному плавлению была ключевым признаком для сохранения стабильности размера частиц эмульсии в стрессовых условиях.

Скрининг эксципиентов для восстановления SE.

Исходя из предполагаемого механизма неблагоприятного результата проводили скрининг эксципиентов для идентификации соединений, которые сохраняли характеристики эмульсии и были устойчивыми к обратному плавлению (табл. 1, фиг. 4). Эксципиенты распределяли на четыре класса в зависимости от структуры лепешки и сохранения характеристик эмульсии после восстановления. Репрезентативные данные для этих классов показаны на фиг. 5.

Сравнение характеристик составов между восстановленными 2% (об./об.)
масляными SE в 5% составах (мас./об.)

Экципиент	Внешний вид лепешки	Расслоение (1 час)	PdI	Z-средние значение, DLS (d., нм)	Средний зета- потенциал (мВ)	pH
Не лиофилизированная SE						
SE (исходный материал 10% об./об.)	Жидкость; молочно- белая эмульсия	Отрицательный результат	0,10	99,7	-8,6	5,5
Трегалоза (до лиофилизации)	Жидкость; молочно- белая эмульсия	Отрицательный результат	0,19	115,6	-9,6	6,0
Класс 1: формируют лепешки, сохраняют эмульсии						
Трегалоза	Белая лепешка	Отрицательный результат	0,21	136,8	-18,9	5,9
Декстроза	Губкообразная белая лепешка	Отрицательный результат	0,17	112,6	-18,7	6,1
Лактоза	Белая лепешка привлекательного вида	Отрицательный результат	0,19	159,3	-19,0	5,9
Мальтоза	Белая лепешка привлекательного вида	Отрицательный результат	0,21	127,3	-21,5	6,2
Сахароза	Губкообразная белая лепешка	Отрицательный результат	0,22	115,5	-18	6,1
Рафиноза	Белая лепешка увеличенного объема	Отрицательный результат	0,24	149	-24,2	5,8
Манноза	Губкообразная белая лепешка	Отрицательный результат	0,12	110,2	-15	6,1
Фруктоза	Губкообразная белая лепешка	Отрицательный результат	0,11	121,9	-16,8	5,5
Лактулоза	Белая лепешка	Отрицательный результат	0,19	141,6	-22	5,7
Класс 2: не формируют лепешки, сохраняют эмульсии						
Рибоза	Без лепешки, Белая/пузырящаяся пленка	Отрицательный результат	0,23	130,8	-11,4	5,2
Класс 3: формируют превосходные лепешки, разрушают эмульсии						
Декстран 40,000	Губкообразная белая лепешка	Отрицательный результат	0,84	1000+	-27,8	5,5
PEG 3350	Белая лепешка привлекательного вида	Положительный результат	0,78	970,9	-24,6	3,3
Маннит	Белая лепешка	Положительный результат	0,90	1000+	-19,4	2,9
Стахиоза	Белая лепешка привлекательного вида	Положительный результат	0,60	253,6	-23,4	6,8
Дипиколиновая кислота (0,5%)	Белая лепешка привлекательного вида	Положительный результат	0,93	1000+	-6,7	5,1
Класс 4: не формируют лепешки, разрушают эмульсии						
Сорбит	Нет лепешки, прозрачная пленка	Положительный результат	0,83	1000+	-24,8	5,1
Никотиновая кислота (0,5%)	Нет лепешки, толстая белая пленка	Положительный результат	0,61	265,4	-6,2	5,3
Пролин	Нет лепешки, застывшие пузыри	Положительный результат	0,81	742	-5,5	4,3

Экципиенты 1 класса формировали в белые лепешки с диапазоном морфологии лепешки и не значительно изменяли характеристики эмульсии после лиофилизации (табл. 1, фиг. 4А-4В). Этот класс

включал трегалозу, декстрозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, рафинозу, маннозу, фруктозу и лактулозу. Размер частиц восстановленной эмульсии составлял менее 200 нм, не наблюдали расслоения в течение одного часа и PdI составлял менее 0,25. Зета-потенциалы снижались от -9 мВ до от -15 до -25 мВ. Значение pH варьировалось от 5,4 до 6,2. Внешний вид лепешки, лиофилизированной SE в 5% трегалозе, которая является репрезентативным составом 1 класса, был приемлемым несмотря на небольшое сморщивание (фиг. 5А). Расслоения не наблюдали в течение 24 ч (фиг. 5В), и распределение размера частиц оставалось однородным ниже 150 нм (фиг. 5С).

Рибоза, эксципиент 2 класса, не образовывала лепешку в лиофилизированной форме и вместо этого образовывала пленку (фиг. 5А), однако эмульсию можно было восстановить с приемлемым размером частиц, PdI, зета-потенциалом и pH (табл. 1, фиг. 4А-4В).

Эксципиенты 3 класса формировали хорошие лепешки, однако нарушали эмульсию после восстановления (табл. 1, фиг. 4 и 5). Размеры частиц восстановленной эмульсии были выше 200 нм и величины PdI были большими, составляя от 0,59 до 0,93. Значение pH и, следовательно, зета-потенциал, широко варьировались в этой группе. В процессе лиофилизации происходило большое изменение pH, наблюдаемое для составов, содержащих PEG и маннит. pH до лиофилизации доводили до 5,5. Как и ожидалось из большого размера частиц и высокой полидисперсности, эксципиенты 3 класса вызывали расслоение после восстановления (табл. 1, фиг. 5В).

Эксципиенты 4 класса не формировали лепешек и нарушали эмульсию аналогично соединениям 3 класса, хотя вместо расслоения эти составы абсолютно не восстанавливались (табл. 1, фиг. 4 и 5). Каждый из этих эксципиентов приводил к большим частицам SE с высокими величинами PdI, и величинами pH от 4,3 до 5,1. Дипиколиновая кислота и никотиновая кислота были относительно нерастворимыми в воде, что означает, что эти составы получали в 10% концентрации по массе относительно других составов. Это может быть способствующим фактором плохого сохранения эмульсии этими эксципиентами.

Структурный скрининг единичных эксципиентов в отношении термостабильности лепешки.

После идентификации альтернативных эксципиентов для лиофилизации проводили оценку термостабильности лепешки для выбора формирующих лепешку эксципиентов. Это использовали в качестве способа идентификации эксципиентов с более высокими температурами плавления и большей устойчивостью к обратному плавлению (табл. 2). Эксципиенты 1 класса имели наиболее низкие температуры начала в диапазоне от мгновенного, что означает при или ниже начальной температуры 27°C, до 78°C. Средние температуры плавления находились в диапазоне от 36 до 94°C. Эксципиенты 3 класса имели температуры начала выше 90°C и все имели средние температуры плавления выше 100°C. Маннит продемонстрировал наиболее высокую стабильность лепешки с узким диапазоном температур плавления со средним значением 160,1°C. Репрезентативные термограммы плавления лепешки показаны на фиг. 6А. Сравнение эксципиентов на основе температур начала плавления и температур плавления лепешки показаны на фиг. 6В. Оказалось, что мономерные сахара имеют значительно более низкие температуры плавления, чем эксципиенты на основе полимерных сахаров.

Таблица 2
Сравнение характеристик плавления лепешки между 2% (об./об.) маслом в SE в 5% составах (мас./об.)

Эксципиент (5% масс./об.)	T _{начала} (°C)	t _m (°C)	Диапазон	Класс	Длина полимера сахара
			плавления (°C) при интенсивности от 25 до 75%		
Декстроза	Ниже 27	36,4	32,5–39,2	1	1
Манноза	Ниже 27	47	40,8–50,6	1	1
Фруктоза	Ниже 27	38,1	34,3–41,5	1	1
Трегалоза	75	91,8	86,0–94,7	1	2
Лактоза	78	94,4	89,5–97,7	1	2
Мальтоза	58	82,5	73,7–87,0	1	2
Сахароза	39	67,4	59,2–73,4	1	2
Лактулоза	57	77,3	70,8–83,7	1	2
Рафиноза	55	81,9	71,6–88,1	1	3
Стахиоза	95	109,2	104,7–111,8	3	4
Маннит	158	160,1	158,6–161,1	3	NA

Влияние термостабильности лепешки на стабильность состава.

Для оценки корреляции между температурой плавления лепешки и термической стабильностью оценивали скорости увеличения размера частиц для SE в различных сахарах с различными температурами плавления при 90°C. Исследовали отличие в стабильности между составами с 5% декстрозой, сахарозой, мальтозой, трегалозой и составом с 15% лактозой с широко различающимися температурами плавления (фиг. 7). Состав с 15% лактозой был идентифицирован как имеющий более высокую температуру плавления, чем состав с 5% лактозой, и он был выбран, поскольку его температура плавления была значительно выше стрессовой температуры хранения 90°C. Было обнаружено, что декстроза имеет наиболее низкую температуру плавления и она претерпевала наиболее быстрый рост размера частиц (фиг. 7А). Сахароза, мальтоза и трегалоза имели промежуточные температуры плавления и претерпевали промежуточные скорости плавления. По мере увеличения температуры плавления лепешек в составах этот рост размера частиц снижался, причем 15% лактоза имела наиболее высокую температуру плавления и наиболее низкую скорость роста размера частиц. Кроме того, наблюдали раздвоение скорости роста частиц (фиг. 7В) между образцами с t_m выше и ниже температуры хранения, что обеспечивает дальнейшие доказательства того, что обратное плавление лепешки было основным механизмом разрушения вследствие термической деградации.

Вследствие обнаружения того что маннит увеличивал термостабильность лепешки (табл. 2), различные эксципиенты 1 класса I объединяли с маннитом в попытках получить составы, которые сохраняли эмульсии, но имели более высокую стабильность лепешки (табл. 3, фиг. 8). Эксципиенты 1 класса уменьшали увеличение размера частиц эмульсии в присутствии маннита. Добавление 0,2% мас./об. маннита не увеличивало размер частиц или T_m . 5% мас./об. маннит значительно увеличивал T_m лепешки, а также увеличивал размер частиц эмульсии и PdI и одновременно снижал pH.

Таблица 3

Сравнение характеристик лепешки между 2% (об./об.) масляной SE в 5% составах (мас./об.), либо с 0,2, либо с 0,5% (мас./об.) маннитом

Эксципиент (5% масс./об.)	Концентрация маннит (%) масс./об.)	$T_{\text{начала}}$ (°C)	t_m (° C)	Диапазон плавления (°C) при интенсивности от 25 до 75%	pH	PdI	Z-среднее значение, DLS (d., нм)
Трегалоза	0,2	64	83,8	78,5-87,1	6,0	0,19	138,6
Трегалоза	5	81	124,4	111,9-136,7	5,3	0,24	162,4
Декстроза	0,2	ниже 27	43,1	37,4-47,3	5,9	0,18	114,4
Декстроза	5	84	115,9	106,3-121,7	5,0	0,17	123,8
Лактоза	0,2	68	87,9	83,2-90,9	6,0	0,24	165,2
Лактоза	5	141	148,6	146,3-150,1	5,2	0,24	175
Мальтоза	0,2	57	78,6	72,3-83,3	6,1	0,26	136,5
Мальтоза	5	83	121,6	107,4-136,4	5,3	0,25	154,4
Сахароза	0,2	42	64,7	56,8-71,0	6,1	0,20	110,9
Сахароза	5	78	124,7	113,1-129,0	5,3	0,21	125,9

Пример 2. Стабильность лиофилизированных адьювантных вакцин против туберкулеза.

Единственную одобренную вакцину от туберкулеза (ТВ), бациллу Кальметта-Герена (BCG), впервые использовали у человека в 1921 г., и она является эффективной в отношении уменьшения встречаемости диссеминированного ТВ у детей. Однако было показано, что BCG является неэффективной в отношении предупреждения легочного ТВ у подростков и взрослых (Checkley et al., 2011, Trends Pharmacol. Sci., 32:601-606; Rowland et al., 2011, Expert Rev. Вакцины, 10:645-658; Anderson et al., 2005, Nat. Rev. Microbiol., 3:656-662). Математическое моделирование влияния внедрения гипотетической новой вакцины против ТВ с 60% эффективностью прогнозирует 80% снижение заболеваемости к 2050 г. (Abu-Raddad et al., 2009, PNAS, 106:13980-13985). Таким образом, существует срочная необходимость в новой вакцине против ТВ либо для усиления иммунитета, индуцированного BCG, либо для замены BCG. Защитный иммунитет против *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) требует как продукции TNF, так и продукции IFN- γ CD4 T-клетками (Flynn et al., 2001, Annu. Rev. Immunol., 19:93-129; Cooper A.M., Annu. Rev. Immunol.; 27:393-422). Был разработан рекомбинантный антиген, представляющий собой слитый белок, состоящий из четырех белков Mtb: Rv3619, Rv1813, Rv3260 и RV2608, обозначаемый как ID93. Эти белковые компоненты были идентифицированы как распознаваемые T-клетками человека либо из инфицированных

ТВ, либо из иммунизированных BCG доноров, и они защищают против нагрузки Mtb в моделях на мышах и морских свинках, когда они находились в паре с адьювантом (Bertholet et al., 2010, *Sci. Transl. Med.*, 2:53ra74; Bertholet et al., 2008, *J. Immunol.*, 181:7948-7947), который индуцирует надежные ответы TH1, таким как синтетический агонист TLR4 гликопиранозиллипидный адьювант, составленный в стабильной эмульсии типа "сквален в воде" (GLA-SE). ID93+GLA-SE в настоящее время проходит тестирование безопасности фазы I у добровольцев-людей.

Как ID93, так и GLA-SE были стабильными при хранении в течение более одного года в условиях поддержания холодной цепи. В этих условиях не наблюдали изменений концентрации белка, концентрации GLA, размера частиц или физического внешнего вида. Наблюдение стабильности при 4°C проходило без оцененного времени до деградации. Хотя стабильность ID93+GLA-SE была равной с другими вакцинами, было желательным повышение термостабильности вакцины для уменьшения потребности в непрерывном поддержании холодной цепи. Одним из подходов для повышения стабильности вакцины при повышенных температурах была лиофилизация антигенных компонентов вакцины, которые затем смешивают с адьювантом в момент применения. Однако этот подход требовало поддержания условий холодной цепи для адьюванта и увеличивало технологическую нагрузку вакцинации. Для решения этой проблемы был разработан единый флакон как с антигеном ID93, так с адьювантом GLA-SE (называемые "однофлаконными").

Материалы и способы.

Приготовление и лиофилизация образца.

Конструирование, экспрессия и очистка тандемного слитого белка ID93, содержащего гены Rv3619, Rv1813, Rv3620 и Rv2608 Mtb, описаны ранее (Bertholet et al., 2010, *Sci Transl Med*, 2:53ra74). В кратком изложении слитый белок ID93 экспрессировали в *E.coli*, очищали в денатурирующих условиях посредством хроматографии на колонках с DEAE и Q Sepharose и анализировали с использованием SDS-PAGE на 4-20% геле Tris-глицин (Invitrogen). GLA (также известный как PHAD) приобретали от Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). GLA-SE, содержащий 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), составляли в соответствии с описанными ранее способами (Orr et al., 2013, *J. Control. Release*, 172:190-200; Anderson et al., 2010, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 75:123-32). В кратком изложении эмульсию GLA-SE получали путем смешения забуференной водной фазы (полоксамер 188 и глицерин в аммоний-фосфатном буфере, pH 5,1) и масляной фазы (DMPC и GLA, диспергированные в сквалене посредством обработки ультразвуком при 70°C), а затем микрофлуидизации смеси с использованием Microfluidics M110P (Newton, MA) в течение 12 проходов при 30000 фунт/кв. дюйм. Концентрации компонентов в эмульсии представляли собой 10% об./об. сквален, 1,9% мас./об. фосфатидилхолин, 0,1% мас./об. полоксамер 188, 2,3% мас./об. глицерин и 25 мМ аммоний-фосфатный буфер. GLA-SE разбавляли до указанных концентраций для применения.

Для анализа адьювантной вакцины GLA-SE жидкие и лиофилизированные образцы приготавливали с объемами заполнения 1,5 мл в 3-мл стеклянных флаконах. Однофлаконные образцы, содержавшие ID93 (5 мкг/мл)+GLA-SE (50 мкг/мл, общее содержание масла 2%) приготавливали в 20 мМ триметамине (Tris) при pH 8,0 (Coler et al., 2011, *PLoS One*, 6, e16333). Составленные в отдельных флаконах ID93 или GLA-SE приготавливали в концентрации, в два раза превышающей концентрацию однофлаконных образцов (10 мкг/мл ID93 или 100 мкг/мл GLA, общее содержание масла GLA-SE 4%) и смешивали 1:1 перед инъекцией. Образцы для SDS-PAGE приготавливали в концентрации ID93 100 мкг/мл для облегчения анализа. Лيوфилизированные образцы также содержали 5% (мас./об.) D-трегалозы дигидрат в качестве стабилизатора, и лиофилизацию проводили с использованием настольного лиофилизатора Advantage 2.0 EL-85 от VirTis (Gardiner, NY). Параметры лиофилизации включали схему термической обработки, включающей стадию замораживания в течение 10 ч от 4 до -40°C, и стадию отжига при -15°C. Первичная фаза высушивания (при 100 мТорр (13,3 кПа)) длилась 18 ч от -40 до 25°C. Наконец, вторичную фазу высушивания проводили при 50 мТорр (6,6 кПа) при 25°C в течение 9 ч. Все образцы закупоривали в атмосферном газе при 500 мТорр (67 кПа), герметизировали с использованием алюминиевых крышек и хранили при 4°C до применения. Образцы, подвергнутые стрессовым условиям нагревания, инкубировали при 50°C в течение 30 суток и не подвергнутые стрессовым условиям образцы хранили при 4°C перед инъекцией.

Для анализа адьювантной вакцины GLA-SE лиофилизированные образцы приготавливали с объемами заполнения 1,5 мл в 3-мл стеклянных флаконах. Однофлаконные образцы содержали 2% (об./об.) масляную SE, 50 мкг/мл SLA, 100 мкг/мл ID93, 20 мМ Tris pH 8,0 и 5% (мас./об.) трегалозу. Образцы лиофилизировали с использованием настольного лиофилизатора Advantage 2.0 EL-85 от VirTis (Gardiner, NY). Параметры лиофилизации включали схему термической обработки, включающей стадию замораживания в течение 10 ч от 4 до -40°C и стадию отжига при -15°C. Первичная фаза высушивания (при 100 мТорр) длилась 18 ч от -40 до 25°C. Наконец, вторичную фазу высушивания при 50 мТорр использовали при 25°C в течение 9 ч. Все образцы закупоривали в атмосферном газе при 500 мТорр, герметизировали с использованием алюминиевых крышек и хранили при 4°C до применения. Образцы, подвергнутые стрессовым условиям нагревания, инкубировали при 50°C в течение 30 суток и не подвергнутые стрессовым условиям образцы хранили при 4°C. Дублированные флаконы (обозначаемые как A и B)

охарактеризовывали. Восстановление образца проводили посредством 1,5 мл фильтрованной H₂O.

Восстанавливающий SDS-PAGE.

Восстанавливающий SDS-PAGE проводили с использованием буфера для образца NuPAGE LDS Life Technologies (Grand Island, NY) с добавлением 1,25% β-меркаптоэтанола и инкубировали при 90°C в течение 15 мин. Образцы анализировали при 180 В в течение 65 мин с использованием 1 мкг ID93 на дорожку в готовых кассетах с 4-20% акриламидным трис-глицериновым гелем Novex от Life Technologies. Гели окрашивали в течение ночи с использованием SimplyBlue SafeStain от Life Technologies перед удалением красителя, высушиванием и визуализацией. Интенсивность полос сравнивали с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH) (Schneider et al., 2012, Nat. Methods, 9:671-675).

Анализ частиц.

Измерение размера частиц, полидисперсности и зета-потенциала проводили, как описано ранее (Fox et al., 2008, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 65:98-105) с использованием Nano-ZS от Malvern (Worcestershire, Великобритания) после разведения в 100 раз в сверхчистой воде, фильтрованной через 20-нм фильтр Anotop plus от Whatman (Maidstone, Kent, Великобритания). Анализ по отслеживанию наночастиц проводили с использованием NanoSight LM10 (Amesbury, Великобритания) с лазером при 405 нм и камерой Hamamatsu Orca Flash 2.8 CMOS (Hamamatsu, JP). Образцы разбавляли 1:105 в сверхчистой воде, фильтрованной через 20-нм фильтр, тремя стадиями. Каждый образец разбавляли и независимо анализировали четыре раза для учета погрешности разведения. Для каждого образца проводили видеозапись в течение девяноста секунд с оптимизированными настройками затвора и усиления. Проводили регуляцию гистограммы камеры для максимизации чувствительности. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения NanoSight NTA 2.3 (Wiltshire, Великобритания) в стандартном режиме.

Химическая целостность адьюванта.

Мониторинг концентраций сквалена, DMPC, GLA и SLA проводили с использованием обращено-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ), как описано ранее (Fox et al., 2008, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 65:98-105). Использовали Agilent 1200 (Santa Clara, CA) и ESA Biosciences Corona Charged Aerosol Detector (CAD; Chelmsford, MA) с C18-мкм колонкой (4,6×250 мм) от Waters Atlantics (Milford, MA). Подвижная фаза А содержала метанол, хлороформ и воду в соотношении 75:15:10 (об./об./об.), 20 мМ ацетат аммония и 1% уксусную кислоту. Подвижная фаза В содержала метанол и хлороформ в соотношении 50:50 (об./об.), 20 мМ ацетат аммония и 1% уксусную кислоту. Образцы приготавливали разведением (1:20) в подвижной фазе В, 9 мкл инжесировали в колонку при 30°C и использовали элюирование с градиентом подвижной фазы А от 100 до 10% в течение 45 мин. Стандартные кривые аппроксимировали с использованием полиномиальной аппроксимации второго порядка, рекомендованной производителем детектора, и концентрации образца определяли посредством интерполяции.

Животные и иммунизации.

Самки мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель приобретали от Charles River и содержали в определенных условиях без патогенов. После инфицирования животных поддерживали в условиях изоляции Animal Biosafety Level 3. Мышей иммунизировали три раза с интервалами три недели посредством внутримышечной инъекции 100 мкл указанного вакцинного препарата. Для иммунизации BCG 5×10⁴ к.о.е. (Pasteur strain, Sanofi Pasteur) инъесировали внутрикожно один раз в момент первой субъединичной иммунизации.

Подсчет клеток крови.

Периферическую кровь собирали от мышей (N=5/группа) через 18 ч после иммунизации. Цельную кровь окрашивали на CD90.2 (клон 53-2.1) и CD19 (клон 6D5). Добавляли Sphero AccuCount Rainbow Particles (Spherotech, Lake Forest, IL) в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки промывали и ресуспендировали в PBS. Вплоть до 10⁶ событий собирали на проточном цитометре с LSRFortessa четырьмя лазерами (BD Biosciences). Данные анализировали с использованием FlowJo. Абсолютные количества CD19+ В-клеток и CD90.2+ Т-клеток на микролитр крови вычисляли в соответствии с инструкциями изготовителя.

Антительные ответы.

Сыворотки мыши (N=5/группа) получали через 21 сутки после иммунизации посредством сбора ретроорбитальной крови в пробирки для сбора сыворотки microtainer (VWR International, West Chester, PA) с последующим центрифугированием. Затем каждый образец сыворотки анализировали с использованием ELISA с улавливанием антител. В кратком изложении планшеты для ELISA (Nunc, Rochester, NY) покрывали рекомбинантным антигеном в концентрации 1 мкг/мл в 0,1 М бикарбонатном буфере и блокировали 1% BSA-PBS. Затем в планшеты последовательно и после промываний PBS/Tween20 добавляли серийно разбавленные образцы, антитело против IgG мыши, IgG1 или IgG2c-HRP (все от Southern Biotech, Birmingham, AL) и ABTS-H₂O₂ (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Планшеты анализировали при 405 нм (ELX808, Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT).

Внутриклеточное окрашивание цитокинов.

Через один месяц после последней иммунизации выделяли спленоциты от пяти животных на груп-

пы. Эритроциты лизировали с использованием буфера для лизиса эритроцитов (eBioscience) и ресуспендировали в RPMI 1640 и 10% FBS. Клетки высевали в количестве 2×10^6 клеток/лунка в 96-луночные планшеты и стимулировали в течение 1 ч средой или ID93 (10 мкг/мл) при 37°C. Добавляли GolgiPlug (BD Biosciences) и клетки инкубировали в течение дополнительных 7 ч при 37°C. Клетки промывали и подвергали поверхностному окрашиванию меченными флуорохромом антителами к CD4 (клон GK1.5), CD8 (клон 53-6.7) и CD44 (клон IM7) (BioLegend и eBioscience) в присутствии антител к CD16/32 (клон 2.4G2) в течение 20 мин при 4°C. Клетки промывали и обеспечивали их проницаемость посредством Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали два раза Perm/Wash (BD Biosciences) и подвергали внутриклеточному окрашиванию меченными флуорохромом антителами к IFN- γ (клон XMG-1.2), IL-2 (JES6-5H4), TNF (MP6-XT22), CD154 (клон MR1), IL-5 (клон TRFK5) и IL-17A (клон TC11-18H10.1) (BioLegend и eBioscience) в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали и ресуспендировали в PBS. Вплоть до 106 собирали на проточном цитометре с LSRFortessa четырьмя лазерами (BD Biosciences). Данные анализировали с использованием FlowJo. Клетки улавливали следующим образом: синглеты>лимфоциты>CD4+CD8->CD44+>положительные по цитокинам. Заражение аэрозолями *M. Tuberculosis* и подсчет Через четыре недели после последней иммунизации мышей (n=7/группа) подвергали аэрогенному инфицированию *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC № 35718; American Type Culture Collection) с использованием генератора аэрозоля GlasCol, откалиброванного для доставки 50-100 бактерий в легкие. Для подтверждения количества доставляемых бактерий дополнительных трех неиммунизированных животных на инфекцию умерщвляли через одни сутки и количественно определяли бактериальную нагрузку в легких. Защиту определяли через три недели после заражения путем извлечения легких из инфицированных мышей, гомогенизации ткани в 0,1% PBS-Tween 80 и посева 5-кратных серийных разведений на чашках с агаром 7H10 (Molecular Toxicology) для определения бактериального роста. Бактериальные колонии подсчитывали после инкубации при 37°C с 5% CO₂ в течение 14-21 суток.

Статистические методы.

Бактериальную нагрузку нормализовали посредством log₁₀-преобразования. Статистическую значимость отличий в бактериальной нагрузке, продукции цитокинов, количестве клеток крови и титрах антител определяли с использованием одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Бонферрони с использованием Prism 5 (программное обеспечение Graph-Pad).

Результаты.

Физико-химическая характеристика адъювантного вакцинного состава GLA-SE.

Разрабатывали режим лиофилизации для этой однофлаконной адъювантной вакцины. При лиофилизации образовывалась белая частично сморщенная лепешка и, после восстановления водой повторно образовывалась эмульсия, и она выглядела аналогично эмульсии до лиофилизации (фиг. 9, верхний ряд). Потенциал к увеличению стабильности к термическому стрессу посредством лиофилизации оценивали путем инкубации жидкого или лиофилизованного состава ID93+GLA-SE при 50°C в течение 30 суток. После термической нагрузки не наблюдали видимых изменений в качестве образца (фиг. 9, нижний ряд) по сравнению с не подвергнутым стрессовым условиям образцом (фиг. 9, верхний ряд). Восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии и лиофилизованные лепешки не продемонстрировали никаких дополнительных признаков спадения или изменения цвета.

Характеристики частиц являются ключевыми для эффективной разработки вакцины, поскольку размер частиц определяет скорость и механизм транспортировки вакцины *in vivo*. Поддержание размера частиц ниже 200 нм является желательным, чтобы обеспечить возможность конечной стерилизации продукта фильтрованием; кроме того, размеры частиц <200 нм способны быстро достигать лимфатических узлов (Bachmann et al., 2010, Nature Rev. Immunol., 10:787-796). Для оценки того, изменяет ли совместное составление в одном флаконе или лиофилизация и восстановление однофлаконного состава ID93+GLA-SE биофизические свойства, исследовали размер частиц, концентрацию, полидисперсность и общий зета-потенциал ID93, GLA-SE, однофлаконного состава ID93+GLA-SE и лиофилизованного однофлаконного состава ID93+GLA-SE. Измеренные характеристики частиц после смешения в основном отражали вклад GLA-SE вследствие на пять порядков более высокой концентрации частиц по сравнению с ID93. Составление в одном флаконе ID93 и GLA-SE не влияло на размер частиц относительно GLA-SE отдельно (80 нм в обоих случаях) (фиг. 10A). Лيوфилизация и последующее восстановление ID93+GLA-SE приводили к небольшому увеличению приблизительно на 10 нм, находящемуся в пределах погрешности измерения. ID93 формировал полидисперсные агрегаты с Z-средним диаметром приблизительно 70 нм. Термическая нагрузка на ID93 отдельно снижала наблюдаемый средний размер частиц; однако это не было статистически значимым (p>0,05) (фиг. 10A). Термическая нагрузка на GLA-SE отдельно или в комбинации с ID93 не влияла на размер частиц или концентрацию среди любых исследованных платформ (фиг. 10A и 10D). GLA-SE представлял собой высокоомогенный раствор, что отражалось низкой величиной полидисперсности (фиг. 10B). Хотя степень полидисперсности, наблюдаемая для ID93, была значительно более высокой, смесь ID93 и GLA-SE сохраняла общую низкую полидисперсность, харак-

терную для GLA-SE, отражающую относительные соотношения частиц ID93 и GLA-SE. Важно, что лиофилизированный и восстановленный состав ID93+GLA-SE сохранял этот единообразный размер частиц. Воздействие термической нагрузки не влияло на полидисперсность ID93, GLA-SE или однофлаконного состава ID93+GLA-SE в жидком или лиофилизированном форматах. Как ID93, так и GLA-SE имели общий отрицательный зета-потенциал в текущей конфигурации. Их смешение приводило к среднему зета-потенциалу -13 мВ, на который не влияла лиофилизация (фиг. 10С). При термической нагрузке наблюдали более отрицательный зета-потенциал для всех содержавших GLA-SE образцов; однако это изменение было статистически значимым только для лиофилизированного состава ID93+GLA-SE ($p < 0,025$). Лиофилизация и восстановление ID93+GLA-SE в целом не изменяли физико-химических характеристик по сравнению с не лиофилизированными ID93+GLA-SE. На физико-химические характеристики ID93, но не GLA-SE, значительно влияло воздействие повышенных температур в течение длительного времени.

Для оценки того, как совместное составление в одном флаконе, лиофилизация и термический стресс влияют на химическую целостность ID93+GLA-SE, концентрацию ID93 согласно SDS PAGE и GLA и концентрации сквалена и DMPC (последние два были основными компонентами стабильной эмульсии) оценивали с использованием ОФ-ВЭЖХ. Оценивали образцы, содержавшие 100 мкг/мл ID93, вследствие неспособности обнаружить ID93 в концентрации 5 мкг/мл с использованием SDS-PAGE. Было обнаружено, что однофлаконные образцы, содержавшие 100 и 5 мкг/мл ID93, имеют сходное поведение с точки зрения размера частиц, концентрации частиц, зета-потенциала и профилей деградации GLA в условиях жидкости, лиофилизированного состава и термической нагрузки. Разделение GLA-SE происходило в виде диффузного мазка, вероятно, вследствие разрушения частиц эмульсии посредством SDS, и он был видимым после окрашивания. Лиофилизация и восстановление однофлаконного состава ID93+GLA-SE привели к 5-10% снижению концентрации ID93, предположительно вследствие разведения при восстановлении, что указывает на то, что не происходило значительного гидролиза ID93 (фиг. 11). При воздействии термической нагрузки при 50°C в течение одного месяца происходило значительное снижение количества ID93, присутствующего в ID93+GLA-SE. Лиофилизация ID93+GLA-SE сообщала белку устойчивость к этой деградации, причем 6 и 90% интенсивности полосы ID93 наблюдалось после термического стресса для жидкого и лиофилизированного образцов, относительно не подвергнутых стрессовым условиям образцов соответственно (фиг. 11). Таким образом, лиофилизация ID93+GLA-SE защищала белок ID93 от индуцируемой термическим стрессом деградации.

Как и ожидалось, после смешения GLA-SE 1:1 с ID93, обнаруживалась приблизительно половина первоначальной концентрации GLA, DMPC и сквалена и не происходило утрачивание материала после лиофилизации и восстановления (фиг. 12А). Воздействие на жидкий состав GLA-SE термической нагрузки вызывало 50% снижение концентрации GLA ($p < 0,001$). Это усиливалось совместным составлением в одном флаконе с ID93 до той степени, что после термической нагрузки не обнаруживалось GLA (фиг. 12А). Эта повышенная чувствительность могла быть следствием более основного значения pH однофлаконного состава ID93+GLA-SE по сравнению с GLA-SE отдельно. Эта потеря GLA смягчалась посредством лиофилизации однофлаконного состава ID93+GLA-SE с ~50% GLA, выделенным после восстановления подвергнутого термической нагрузке лиофилизированного состава ID93+GLA-SE (фиг. 12D). GLA был основным термолабильным компонентом GLA-SE, поскольку термическая нагрузка не влияла ни на концентрацию DMPC, ни на концентрацию сквалена (фиг. 12B-12D). Взятые вместе эти данные показали, что два активных компонента ID93+GLA-SE были защищены от индуцируемой нагреванием деградации при лиофилизации.

В целом, лиофилизация ID93+GLA-SE приводила к лепешке от белой до не совсем белой, которая сохраняла химические и биофизические свойства однофлаконного состава ID93+GLA-SE при восстановлении. Воздействие на ID93+GLA-SE термической нагрузки приводило к значительному снижению как ID93, так и GLA. Лиофилизация однофлаконного состава ID93+GLA-SE по большей части смягчала эти потери вследствие термического стресса, что указывает на то, что этот подход может снизить или устранить необходимость в поддержании холодной цепи для этого вакцинного кандидата.

Иммуногенность и эффективность вакцины в адьювантном вакцинном составе GLA-SE.

Для определения того, как термическая нагрузка влияла на биологическую активность ID93+GLA-SE и смягчала ли лиофилизация какие-либо вредоносные эффекты, мышей иммунизировали физиологическим раствором или ID93+GLA-SE, которые хранили в качестве отдельных флаконов жидкого антигена и адьюванта (жидкость), смеси антигена и адьюванта (жидкий однофлаконный состав) или совместно лиофилизированного антигена и адьюванта (лиофилизированный однофлаконный состав). Материал для иммунизации хранили либо при 4°C (т.е. без стрессового воздействия), либо при 50°C (т.е. с термической нагрузкой) в течение одного месяца перед иммунизацией. После иммунизации происходило временное снижение циркулирующих В- и Т-клеток в крови, поскольку происходил хоминг этих клеток в дренирующем лимфатическом узле, где они встречали антиген (Shiow et al., 2006, Nature, 440:540-544). Эта временная лимфопения была названа выключением лимфатического узла, поскольку лимфоциты становились временно уловленными в лимфатическом узле в процессе, необходимом для эффективных взаимодействий между антигенпредставляющими клетками и распознаваемыми ими лимфоцитами. Адьювант GLA-SE усиливал этот эффект, который может быть частично ответственным за его превосходную

адьювантную активность. Иммунизация не подвергнутой стрессовой нагрузке жидкой ID93+GLA-SE индуцировала значительную потерю как В-клеток, так и Т-клеток из крови (фиг. 13А). Воздействие стрессовых условий на жидкость ID93+GLA-SE при 50°C в течение месяца снизило этот эффект, что указывает на то, что активность GLA ухудшалась посредством термического стресса. Не подвергнутый стрессу жидкий однофлаконный состав ID93+GLA-SE индуцировал выключение лимфатических узлов настолько же эффективно, как и жидкая вакцина, однако на этот жидкий однофлаконный материал в большей степени влияла термическая нагрузка, поскольку степень выключения лимфатических узлов была значительно снижена, что, вероятно, отражало потерю поддающегося обнаружению GLA (фиг. 13А). Лиофилизированный однофлаконный состав ID93+GLA-SE индуцировал временную лимфопению в меньшей степени, чем жидкий материал, однако в отличие от жидкого однофлаконного материала, этот эффект на ухудшался при термической нагрузке на лиофилизированную однофлаконную вакцину. Эти данные позволили предположить, что биологическая активность адьюванта GLA-SE была чувствительной к термической нагрузке, и она усиливалась составлением в одном флаконе с антигеном ID93. Важно, что лиофилизация сообщала однофлаконному составу ID93+GLA-SE устойчивость к повреждениям вследствие термической нагрузки, как определяется этим параметром.

Для более полного исследования влияния термического стресса и лиофилизации на биологическую активность ID93+GLA-SE оценивали титры ID93-специфических антител после иммунизации. Иммунизация ID93+GLA-SE индуцировала смешанный ответ IgG1, IgG2c, который был сдвинут в направлении продукции IgG2c. Это отражало определяемые IFN- γ CD4 Т-клеточные ответы, вызываемые ID93+GLA-SE. Воздействие термической нагрузки в значительной степени ухудшало способность жидких ID93+GLA-SE индуцировать поддающиеся измерению титры антител (фиг. 13В). Вероятно, это было следствием деградации белка ID93 при термической нагрузке (фиг. 11). Хотя совместное составление в одном флаконе ID93+GLA-SE не изменяло величины антительного ответа, когда вакцину хранили при 4°C, это не было достаточным для предотвращения утраты потенциала к индукции антител, вызываемого термической нагрузкой. Напротив, лиофилизированный однофлаконный состав ID93+GLA-SE индуцировал устойчивые антительные ответы, сходные по величине и смещению IgG1/IgG2c с жидким не подвергнутым стрессовым условиям материалом, и они не ухудшались термической нагрузкой (фиг. 13В).

ID93+GLA-SE защищали против *M. tuberculosis* посредством индукции ID93-специфических CD4 Т-клеток, которые продуцируют IFN- γ , TNF и IL-2 (т.е. TH1-клетки). Воздействие термического стресса снижало частоту ID93-специфических TH1-клеток при измерении по продукции любых из этих цитокинов практически на 50% после третьей иммунизации жидкими ID93+GLA-SE (фиг. 13С). Этот TH1-ответ на подвергнутые стрессовым условиям жидкие ID93+GLA-SE сохранялся несмотря на деградацию белка ID93, что вероятно отражало присутствие иммуногенных пептидов и остаточного GLA после термического воздействия. Составление в одном флаконе жидкого состава ID93+GLA-SE немного усиливало величину TH1 при хранении при 4°C, однако воздействие термического стресса полностью устраняло способность жидкого не однофлаконного состава ID93+GLA-SE индуцировать такой ответ.

Лиофилизированный однофлаконный состав ID93+GLA-SE индуцировал TH1-ответы на уровне, сходном с ответами, вызываемыми жидкими ID93+GLA-SE. Критически важным является то, что в отличие от жидких или жидких составленных в одном составе ID93+GLA-SE, лиофилизированный составленный в одном составе ID93+GLA-SE полностью сохранял способность индуцировать ID93-специфические TH1 клетки после термического стресса (фиг. 13С). Ранее было определено, что ID93-специфическая индуцируемая CD4 Т-клетками иммунизация нативным ID93+GLA-SE индуцирует исключительно TH1-клетки, не продуцирующие IL-5 (TH2) или IL-17 (TH17) при повторной стимуляции (Org et al., 2013, Eur. J. Immunol.). Составление в одном флаконе, лиофилизация и/или воздействие термической нагрузки не усиливали индукцию ни TH2, ни TH17 клеток посредством ID93+GLA-SE при измерении по поддающейся обнаружению продукции IL-5 или IL-17. Было предположено, что продукция CD154 после стимуляции является генерализованным маркером активации CD4 Т-клеток независимо от продукции цитокинов (Frentsch et al., 2005, Nat. Med., 11:1118:1124). Во всех случаях уровни экспрессии CD154 близко отражали уровни экспрессии как IFN- γ , так и TNF, далее указывая на то, что отсутствовало отклонение от программирования TH1. В целом раннее нарушение выхода лимфоцитов из крови (фиг. 13А) строго коррелировало с последующей утратой как антительного (фиг. 13В), так и CD4 Т-клеточного ответа (фиг. 13С) на вакцинацию ID93+GLA-SE.

Для оценки того, как термическая нагрузка, составление в одном флаконе и лиофилизация влияли на защитную эффективность ID93+GLA-SE, иммунизированных мышей заражали низкой дозой аэрозоллированных *M. tuberculosis*. Через три недели животные, которых иммунизировали жидким составом ID93+GLA-SE, были в значительной степени защищены от *M. tuberculosis* относительно животных, иммунизированных физиологическим раствором, при измерении по сниженной бактериальной нагрузке в легких и селезенке (фиг. 14А и 14В). Термическая нагрузка на жидкость ID93+GLA-SE отдельно не нарушала эту защитную эффективность, вероятно отражающую остаточный ID93-специфический TH1-ответ, индуцируемый этой иммунизацией (фиг. 13С). Составление в одном флаконе ID93+GLA-SE не нарушало защитной эффективности при хранении при 4°C, однако жидкая однофлаконная вакцина

утрачивала всю защитную эффективность при воздействии термической нагрузки. Лиофилизация однофлаконного состава ID93+GLA-SE сохраняла защитную эффективность, и, что наиболее важно, лиофилизация ID93+GLA-SE устраняла потерю защитной эффективности вследствие термической нагрузки (фиг. 14А и 14В).

Совместная лиофилизация и восстановление антигена и наноэмульсионного адьюванта не изменяли значительно физико-химические характеристики вакцины. При восстановлении концентрации как антигена, так и агониста TLR4 GLA, а также скваленового масла по существу не отличались от концентраций в исходном материале. Длительное воздействие термической нагрузки имело небольшой эффект на характеристики либо жидкой однофлаконной, либо однофлаконной лиофилизированной вакцины; однако термическое воздействие привело к химической деградации как антигена, так и агониста TLR4, но не сквалена или фосфолипидных компонентов адьюванта. Совместная лиофилизация частично защищала против потери агониста TLR4.

Потеря GLA вследствие термической нагрузки была сильным прогностическим фактором сниженного иммунного ответа и защитной эффективности вакцин при введении экспериментальным животным. Хотя эта взаимосвязь не была полностью линейной, снижение GLA в жидких образцах приводило к снижению частоты ID93-специфических CD4 Т-клеток после иммунизации. Полная потеря GLA в подвергнутом термической нагрузке жидком однофлаконном составе ID93+GLA-SE соответствовала утрате индукции CD4 Т-клеток. Напротив, деградация белка ID93 в жидких образцах имела малое влияние на величину CD4 Т-клеточного ответа. Без связи с теорией это, вероятно, может быть приписано сохранению иммунодоминантных пептидов, необходимых для индукции Т-клеточного ответа в подвергнутых термической нагрузке образцах. С другой стороны, индуцированная нагреванием деградация ID93 в значительной степени снижала величину антительного ответа на вакцину. Многие из ID93-специфических антител могут быть конформационно зависимыми. Кроме того, остаточный антительный ответ предпочтительно представлял собой ответ IgG1, что указывает на потерю запускаемого GLA смещения в направлении IgG2с. Совместная лиофилизация ID93+GLA-SE в значительной степени препятствовала индуцируемой термической нагрузкой утрате ID93-специфических антительных ответов, что указывает на то, что белковая структура была защищена этим процессом. Это может указывать на то, что защита антигенов от термической нагрузки является более ключевым параметром для вакцин, которые основаны на антительных ответах для защитной эффективности, чем вакцин, таких как ID93+GLA-SE, которые основаны на Т-клетках для защитной эффективности. Действительно подвергнутая термической нагрузке однофлаконная вакцина сохраняла степень защитной эффективности против экспериментального заражения аэрозолированными Mtb. Существует отчетливая взаимосвязь между способностью сохранять концентрацию GLA посредством лиофилизации при термической нагрузке, сохранять индукцию TH1 и поддерживать защитную эффективность.

Физико-химическая охарактеризация адьювантного вакцинного состава SLA-SE.

Был разработан режим лиофилизации для однофлаконного состава SLA-SE адьювантной вакцины ID93. При лиофилизации образовывалась белая частично сморщенная лепешка и после восстановления водой вновь образовывалась эмульсия (фиг. 15). Потенциал к увеличению стабильности к термическому стрессу посредством лиофилизации оценивали путем инкубации образцов в двух экземплярах (А и В) лиофилизированных ID93+SLA-SE при 50°C в течение 30 суток. После термической нагрузки не наблюдали видимого изменения качества образца (фиг. 15; 30 суток, А, и 30 суток, В) по сравнению с не подвергнутым стрессовому воздействию образцом (фиг. 15; 0 суток, А, и 0 суток, В). Восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии, не демонстрировали расслоения через 24 ч после восстановления и лиофилизированные лепешки не демонстрировали никаких дальнейших признаков спадения или изменения цвета.

Для оценки того, как составление в одном флаконе, лиофилизация и термический стресс влияют на химическую целостность ID93+SLA-SE, оценивали концентрацию ID93 в восстановленных составах с использованием SDS PAGE (фиг. 16). Наносили восстановленные образцы, содержавшие 1 мкг/мл ID93, на дорожку. ID93 наблюдали в качестве полосы размером 98 кДа во всех исследованных образцах. Лиофилизация и восстановление подвергнутого стрессовым условиям однофлаконного состава ID93+SLA-SE не приводили к значительному гидролизу ID93 по сравнению с подвергнутым нагрузке однофлаконным составом ID93+SLA-SE (фиг. 16). Таким образом, лиофилизация ID93+SLA-SE защищала белок ID93 от индуцируемой термической нагрузкой деградации.

Для оценки того, изменяла ли термическая нагрузка на восстановленный лиофилизированный однофлаконный состав ID93+SLA-SE биофизические свойства адьювантной вакцины, размер частиц, концентрацию, полидисперсность и общий зета-потенциал лиофилизированного однофлаконного состава ID93+SLA-SE исследовали в стрессовых и не стрессовых условиях. Термическая нагрузка на восстановленный лиофилизированный однофлаконный состав ID93+SLA-SE не изменяла в значительной степени размер частиц или полидисперсные агрегаты (фиг. 17А-17С) или зета-потенциал (фиг. 18) по сравнению с не подвергнутым стрессовому воздействию однофлаконным составом ID93+SLA-SE. Аналогично восстановленному лиофилизированному однофлаконному составу ID93+GLA-SE, термическая нагрузка на восстановленный лиофилизированный однофлаконный состав ID93+SLA-SE приводила приблизительно

к ~50% выделению SLA (фиг. 19).

Пример 3. Лиофилизированный вакцинный эмульсионный состав и длительная стабильность.

Разрабатывали режим лиофилизации для составленного в одном флаконе состава GLA-SE адьювантной вакцины ID93. Состав, оцененный в отношении длительной стабильности, представлял собой тот же состав, который был описан в примере 1, для состава GLA-SE, который состоял из 2% об./об. сквалена, 0,4% мас./об. DMPC, 0,02% мас./об. полоксамера 188, 0,5% мас./об. глицерина и 5 мМ фосфата аммония плюс полипептид ID 93, лиофилизированный в присутствии 20 мМ трометамина и 5% мас./об. трегалозы. При лиофилизации образовывалась белая частично сморщенная лепешка и после восстановления водой вновь образовывалась эмульсия без видимых признаков расслоения (фиг. 20). Потенциал к увеличению устойчивости к термической нагрузке посредством лиофилизации оценивали путем инкубации дублированных образцов (А и В) лиофилизированного состава ID93+GLA-SE при 4, 25 и 37°C в течение одного года.

Данные стабильности в течение 3 месяцев.

Хранение в течение трех месяцев при 4, 25 и 37°C демонстрирует отсутствие изменения внешнего вида лепешки или способности формировать подходящую эмульсию при восстановлении по сравнению с нулевым моментом времени (фиг. 21А и 21В). Лиофилизированные лепешки не демонстрировали никаких дополнительных признаков спадения или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления.

Биофизические свойства лиофилизированной адьювантной вакцины ID93+GLA-SE исследовали через три месяца для образцов, хранившихся при 4, 25 и 37°C, с точки зрения размера частиц (Z -среднее значение, нм) и полидисперсности (PDI). Через три месяца составы не продемонстрировали значительного изменения размера частиц или агрегатов при любых температурах хранения вплоть до 37°C (фиг. 21В).

Для оценки того, как составление в одном флаконе, лиофилизация и термическая нагрузка влияют на химическую целостность полипептида ID93 в лиофилизированной эмульсии, хранившейся при 4, 25 и 37°C в течение трех месяцев, восстановленный состав оценивали посредством SDS PAGE (фиг. 21С). Наносили восстановленные образцы, содержавшие 1 мкг/мл ID93, на дорожку. ID93 наблюдали в качестве полосы размером 98 кДа во всех исследованных образцах. Лиофилизация и восстановление ID93+GLA-SE не вызывали значительного гидролиза полипептида ID93. Таким образом, лиофилизация ID93+GLA-SE защищает белок ID93 от индуцируемой термической нагрузкой деградации.

Химическую целостность состава SE оценивали с использованием ВЭЖХ и анализировали в отношении DMPC и сквалена. Результаты на фиг. 21D демонстрируют отсутствие потери или деградации любого компонента эмульсии типа "масло в воде".

Оценивали концентрацию адьюванта в лиофилизированном составе ID93+GLA-SE, хранившемся при 4, 25 и 37°C (фиг. 21Е). Данные демонстрируют, что не происходило значительной потери GLA относительно первоначальной концентрации 50 мкг/мл при любой температуре хранения через 3 месяца.

Данные стабильности через 6 месяцев.

Хранение в течение шести месяцев при 4, 25 или 37°C демонстрирует отсутствие изменения внешнего вида лепешки или способности образовывать подходящую эмульсию при восстановлении (фиг. 22А и 22В) по сравнению с нулевым моментом времени. Лиофилизированные лепешки не демонстрируют никаких дополнительных признаков спадения или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления.

Биофизические свойства лиофилизированной адьювантной вакцины ID93+GLA-SE, исследовали через шесть месяцев для лиофилизированных образцов, хранившихся при 4, 25 и 37°C, в отношении размера частиц (Z -среднее значение, нм) и полидисперсности (PDI). Через 6 месяцев составы не продемонстрировали значительного изменения размера частиц или агрегатов при любых температурах хранения вплоть до 37°C (фиг. 22В).

Для оценки того, как составление в одном флаконе, лиофилизация и термическая нагрузка влияют на химическую целостность полипептида ID93 в лиофилизированном составе ID93 + GLA-SE после хранения при 4, 25 и 37°C в течение 6 месяцев, восстановленный состав оценивали посредством SDS PAGE (фиг. 22С). Наносили восстановленные образцы, содержавшие 1 мкг/мл ID93, на дорожку. ID93 наблюдали в качестве полосы размером 98 кДа во всех исследованных образцах. Лиофилизация и восстановление ID93+GLA-SE не приводили к значительному гидролизу ID93. Таким образом, лиофилизация ID93+GLA-SE защищает белок ID93 от индуцируемой термической нагрузкой деградации.

Химическую целостность состава SE оценивали с использованием ВЭЖХ и анализировали в отношении DMPC и сквалена. Результаты на фиг. 22D демонстрируют отсутствие потери или деградации любого компонента эмульсии типа "масло в воде".

Оценивали концентрацию адьюванта в лиофилизированном составе ID93+GLA-SE, хранившемся при 4, 25 и 37°C (фиг. 22Е). Данные демонстрируют, что не происходило значительной потери GLA по сравнению с первоначальной концентрацией 50 мкг/мл при температурах хранения 4 или 25°C, однако температура хранения 37°C демонстрирует приблизительно 50% потерю GLA через шесть месяцев.

Данные стабильности через 9 месяцев.

Хранение в течение девяти месяцев при 4, 25 или 37°C демонстрирует отсутствие изменения внеш-

него вида лепешки или способности образовывать подходящую эмульсию при восстановлении (фиг. 23А и 23В) по сравнению с нулевым моментом времени. Лиофилизированные лепешки не демонстрировали никаких дополнительных признаков спадения или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления.

Биофизические свойства лиофилизированной адьювантной вакцины ID93+GLA-SE исследовали через 9 месяцев для образцов, хранившихся при 4, 25 и 37°C с точки зрения размера частиц (Z-среднее значение, нм) и полидисперсности (PdI). Через 9 месяцев составы не продемонстрировали значительного изменения размера частиц или агрегатов при любых температурах хранения вплоть до 37°C (фиг. 23В).

Для оценки того, как составление в одном флаконе, лиофилизация и термическая нагрузка влияют на химическую целостность полипептида ID93 после хранения при 4, 25 и 37°C в течение 9 месяцев, восстановленный состав оценивали посредством SDS PAGE (фиг. 23С). Наносили восстановленные образцы, содержавшие 1 мкг/мл ID93, на дорожку. ID93 наблюдали в качестве полосы размером 98 кДа во всех исследованных образцах. Лиофилизация и восстановление ID93+GLA-SE не приводили к значительному гидролизу ID93. Таким образом, лиофилизация ID93+GLA-SE защищает белок ID93 от индуцируемой термической нагрузкой деградации.

Химическую целостность состава SE оценивали с использованием ВЭЖХ и анализировали в отношении DMPC и сквалена. Результаты на фиг. 23D демонстрируют отсутствие потери или деградации любого компонента эмульсии типа "масло в воде" после хранения в течение девяти месяцев.

Оценивали концентрацию адьюванта в лиофилизированном составе ID93+GLA-SE, хранившемся при 4, 25 и 37°C (фиг. 23Е). Данные демонстрируют, что не происходило значительной потери GLA по сравнению с первоначальной концентрацией 50 мкг/мл при 4 или 25°C, однако 37°C демонстрирует такую же приблизительную 69% потерю GLA через девять месяцев, как наблюдали через шесть месяцев.

Данные стабильности через 12 месяцев.

Хранение в течение двенадцати месяцев при 4, 25 или 37°C демонстрирует отсутствие изменения внешнего вида лепешки или способности образовывать подходящую эмульсию при восстановлении (фиг. 24А и 24В) по сравнению с нулевым моментом времени. Лиофилизированные лепешки не демонстрировали никаких дополнительных признаков спадения или изменения цвета, и восстановленные образцы сохраняли внешний вид эмульсии без расслоения вплоть до 24 ч после восстановления.

Биофизические свойства лиофилизированной адьювантной вакцины ID93+GLA-SE исследовали через 12 месяцев для образцов, хранившихся при 4, 25 и 37°C с точки зрения размера частиц (Z-среднее значение, нм) и полидисперсности (PDI). Через 12 месяцев составы не продемонстрировали значительного изменения размера частиц или агрегатов при любых температурах хранения вплоть до 37°C (фиг. 24В).

Для оценки того, как составление в одном флаконе, лиофилизация и термическая нагрузка влияют на химическую целостность полипептида ID93 после хранения при 4, 25 и 37°C в течение 12 месяцев, восстановленный состав оценивали посредством SDS PAGE (фиг. 24С). Наносили восстановленные образцы, содержавшие 1 мкг/мл ID93, на дорожку. ID93 наблюдали в качестве полосы размером 98 кДа во всех исследованных образцах. Лиофилизация и восстановление ID93+GLA-SE не приводят к значительному гидролизу ID93. Таким образом, лиофилизация ID93+GLA-SE защищает белок ID93 от индуцируемой термическим стрессом деградации через 12 месяцев.

Оценивали концентрацию адьюванта в лиофилизированном составе ID93+GLA-SE, хранившемся при 4, 25 и 37°C (фиг. 23Е). Данные демонстрируют, что не происходило значительной потери GLA по сравнению с первоначальной концентрацией 50 мкг/мл при 4 или 25°C, однако 37°C демонстрирует 69% потерю GLA через 12 месяцев.

Пример 4. Лиофилизированный состав вакцинной эмульсии и стабильность в системах с одним и несколькими эксципиентами с увеличенной термической стабильностью и отсутствием потери адьюванта при более высоких температурах.

Лиофилизированные и составленные эмульсии типа "масло в воде" получали и лиофилизировали с использованием материалов и в соответствии со способами, описанными в примере 1. Лиофилизированный состав стабильной эмульсии типа "масло в воде" (SE) восстанавливали и охарактеризовывали в отношении температуры плавления, влажности, размера частиц и зета-потенциала, химической деградации посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии, результатов скрининга восстановления, результатов скрининга стабильности лепешки и результатов охарактеризации ускоренной стабильности, как описано в примере 1.

Исходя из предварительных экспериментов было предположено, что применение глицерина в качестве обеспечивающего тоничность агента может вносить вклад в термостабильность составов по изобретению при температурах выше 25°C. Проводили исследования для определения того, обеспечит ли удаление глицерина в качестве обеспечивающего тоничность средства в составах по изобретению более высокую термостабильность при температурах выше 25°C в течение более чем 3 месяцев. В дополнение к удалению глицерина оценивали процент биодеградируемого масла, в данном примере сквалена, в отношении термостабильности, и проводили охарактеризацию лепешки при лиофилизации в усовершенствованных термостабильных при 50°C составах для лиофилизации с 2,5% трегалозой и 2,5% маннитом по изобретению способами, описанными в примере 1.

Образцы, как описано в примере 1, соответствуют указанным процентам сквалена (от 2 до 10% об./об. сквалена, как указано), 0,4% мас./об. DMPC, 0,02% мас./об. полоксамера 188, 0,5% мас./об. глицерина и 5 мМ фосфата аммония, которые либо содержали 0,5% мас./об. глицерина, либо были составлены без глицерина плюс или минус 2% об./об. Tris в качестве дополнительного обеспечивающего тоничность агента. Данные на фиг. 25А демонстрируют, что все составы с возрастающей концентрацией сквалена (2-10% об./об.) и лишённые 0,5% глицерина (обозначаемые как без глицерина) образовывали лепешки привлекательного вида при лиофилизации без сморщивания или изменения цвета лепешки даже после 30 суток при 50°C по сравнению с составами, содержащими 0,5% глицерина об./об. (обозначаемые как с глицерином) формируют лепешки, которые являются несколько усохшими и сжатыми сразу как сразу после лиофилизации (момент времени 0 суток), так и через 30 суток после хранения при 50°C. Сравнение восстановления лепешки в расслоения не продемонстрировало заметных различий.

На фиг. 25В и 25С демонстрируется, что отсутствуют заметные различия как в размере частиц (Z -среднее значение, нм), так и в полидисперсности (PDI) (соответственно) для любого из составов после хранения при 50°C в течение 30 суток. На фиг. 25D представлены доказательства того, что присутствие 0,5% об./об. глицерина не влияет на стабильность адьюванта GLA в составе. Ни один из составов эмульсии, полученных с возрастающим содержанием биodeградируемого масла (25-10%) не продемонстрировал никакого снижения концентрации GLA по сравнению с исходной концентрацией (нулевой момент времени, изображенный как 0 на столбике) по сравнению с образцами, восстановленными после хранения лиофилизированных флаконов при 50°C в течение тридцати суток (изображено как 1 на столбике). Эмульсии, лиофилизированные в присутствии глицерина, демонстрируют 30-40% потерю GLA.

Исходя из этих данных вероятно, что вакцинные составы по изобретению можно лиофилизировать, чтобы они выдерживали температуру 50°C, что приведет к лепешкам более привлекательного вида и тем самым, как будет понятно специалисту в данной области, обеспечит более высокую термостабильность.

Пример 5. Разработка и охарактеризация четырех лиофилизированных составов вакцинной эмульсии и стабильность в системах с одним или несколькими эксципиентами с усовершенствованной термической стабильностью и без потери адьюванта при более высоких температурах.

Четыре состава для лиофилизации оценивали в отношении их способности к термозащите эмульсии GLA-SE, описанной в настоящем описании, где все составы были лишены глицерина в качестве регулирующего тоничность средства. Разработанные и оцениваемые составы, представляющие собой 5% трегалозу отдельно (без глицерина) (фиг. 26А), 5% трегалозу мас./об., 0,1% мас./об. маннит (фиг. 26В), 2,5% мас./об. трегалозу, 2,5% мас./об. маннит (фиг. 26С) и 10% мас./об. трегалоза (фиг. 26D), оценивали в отношении формирования лепешки, и внешнего вида, и расслоения после восстановления в момент времени 0 (сразу после лиофилизации), через одну неделю (1 wk), 2 недели (2 wk), 1 месяц (1 mo) и 3 месяца (3 mo) после лиофилизации для образцов, хранившихся в течение указанного периода времени при 4, 25, 37 и 50°C, как указано. Сравнение данных указывает на то, что все образцы образовывали белые лепешки привлекательного вида, причем 5% трегалоза мас./об., 0,1% мас./об. маннит (фиг. 26В), 2,5% мас./об. трегалоза, 2,5% мас./об. маннит (фиг. 26С) образовывали наиболее привлекательные на вид лепешки при всех температурах хранения. Лепешки привлекательного вида, образованные 5% трегалозой мас./об., 0,1% мас./об. маннитом (фиг. 26В), 2,5% мас./об. трегалозой, 2,5% мас./об. маннитом (фиг. 26С) демонстрируют структуру привлекательного вида, как известно в данной области. Таким образом, удаление глицерина в качестве регулирующего тоничность средства из лиофилизированных эмульсий GLA-SE по изобретению обеспечивает структуру лепешки более привлекательного вида, которая сохраняет ее структурную целостность на протяжении диапазона температур от 4, 25, 37 и до 50°C при хранении в течение одной недели (1 wk), 2 недель (2 wk), 1 месяца (1 mo) и 3 месяцев (3mo) (фиг. 26А-26D).

Все лиофилизированные составы хранили при 4, 25, 37 и 50°C в течение одной недели (1 wk), 2 недель (2 wk), 1 месяца (1 mo) и 3 месяцев (3mo), как указано. Образцы извлекали из хранения, восстанавливали и сравнивали в отношении размера частиц (Z -среднее значение, нм), полидисперсности (PDI), pH и содержания GLA после восстановления, как показано на фиг. 27-31.

На фиг. 27 показано сравнение эмульсии GLA-SE до лиофилизации перед добавлением компонентов для лиофилизации (обозначенные на столбиках как "Pre Lyo"), состава GLA-SE перед лиофилизацией (обозначаемые на столбиках как "Lyo") и после лиофилизации с последующим восстановлением (обозначаемых как 0) для каждого состава. Первоначальное сравнение составов продемонстрировало отсутствие заметных отличий между составами для лиофилизации с каждым составом, имеющими соответствующие характеристики восстановленной эмульсии (желаемые характеристики), включая размер частиц с Z -средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм, отсутствие видимых агрегатов, измеряемое с использованием полидисперсности, физиологическими значениями pH и отсутствием заметной потери GLA.

На фиг. 28 представлены различные однофлаконные составы для лиофилизации, хранившиеся при 4°C (столбик 1), 25°C (столбик 2), 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4) в течение одной недели (1 wk). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z -средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). Данные на фиг. 28А

демонстрируют, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемый размер частиц, составляющий менее чем приблизительно 200 нм (фиг. 28A), отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности (фиг. 28B) и физиологическим значениям pH (фиг. 28C). Следует отметить, что хотя средний размер частиц для лиофилизированных лепешек возрастает при 50°C для всех составов приблизительно на 40% по сравнению с другими образцами, размер частиц все еще находится в пределах желаемых менее чем приблизительно 200 нм. Важно, что все исследованные составы, лишенные глицерина, продемонстрировали отсутствие потери GLA после хранения в течение одной недели при любых исследованных температурах.

На фиг. 29 представлены различные однофлаконные составы для лиофилизации, хранившиеся при 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4) в течение двух недель (2 wk). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z-средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). Данные на фиг. 29A демонстрируют, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температурах в диапазоне 37-50°C проявляли желаемый размер частиц менее чем приблизительно 200 нм (фиг. 29A), отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности (фиг. 29B) и физиологическим значениям pH (фиг. 29C). Следует отметить, что хотя средний размер частиц для лиофилизированных лепешек возрастает при 50°C для всех составов приблизительно на 40% по сравнению с другими образцами, размер частиц оказался не измененным на второй неделе и все еще находится в пределах желаемых менее чем приблизительно 200 нм. Важно, что все исследованные составы, лишенные глицерина, продемонстрировали отсутствие потери GLA после хранения в течение одной недели при любых исследованных температурах.

На фиг. 30 представлены различные составы для лиофилизации, хранившиеся при 4°C (столбик 1), 25°C (столбик 2), 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4) в течение одного месяца (1 mo). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z-средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). Данные на фиг. 30A демонстрируют, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температурах в диапазоне 37-50°C проявляли желаемый размер частиц менее чем приблизительно 200 нм (фиг. 30A), отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности (фиг. 30B) и физиологическим значениям pH (фиг. 30C). Следует отметить тенденцию в сторону увеличения среднего размера частиц для состава 2,5% трегалозы, 2,5% маннита от 120 до 175 нм, однако средний размер частиц все еще ниже 200 нм и состав не проявляет никакой потери GLA.

На фиг. 31 представлены различные однофлаконные составы для лиофилизации, хранившиеся при 4°C (столбик 1), 25°C (столбик 2), 37°C (столбик 3) и 50°C (столбик 4) в течение одного месяца (1 mo). Образцы восстанавливали и анализировали в отношении размера частиц (Z-средний диаметр, нм), полидисперсности (PDI) в качестве функции агрегации, pH и концентрации GLA (мг/мл). Данные на фиг. 31A демонстрируют, что все 4 состава для лиофилизации при хранении при температуре в диапазоне 4-50°C проявляли желаемый размер частиц менее чем приблизительно 200 нм (фиг. 31A), отсутствие заметных агрегатов при измерении по полидисперсности (фиг. 31B) и физиологические значения pH (фиг. 31C). Данные в этом примере 5 обеспечивают дополнительные лидирующие составы, являющиеся кандидатами для лиофилизации в одном флаконе эмульсии типа "масло в воде" (SE), содержащей адьювант (GLA), которая при хранении при температурах вплоть до 50°C в течение одного месяца или более проявляет усиленную термостабильность при 50°C.

Настоящее изобретение относится к ряду составов для лиофилизации в одном флаконе эмульсий типа "масло в воде", которые пригодны для вакцинальной доставки антигенов, отдельных адьювантов, множества адьювантов или любой их комбинации, которые имеют особую применимость для снижения или устранения потребности в хранении в условиях холодной цепи, что делает их усовершенствованными относительно данной области.

Последовательности.

Слитый полипептид ID93 с оптимальной His-меткой (SEQ ID NO:

1)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTINYQFGDVAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTA
DFWGGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMAQTDSAVGSSWAGTHLANGSM
SEVMMSEIAGLPIPPIIHYGAIAYAPSGASGKAHQRTPARAEQVALEKCGDKTCKVVSFRTRC
GAVAYNGSKYQGGTGLTRRAAEDDAVNRLEGGRIWNWACNELMTRFMTDPHAMRDMAGRFEVH
AQTVEDEARRMWASAQNISGAGWSGMAEATSLDTMTQMNQAFRNIWNMLHGVRDGLVRDANNYE
QQEQASQQILSSVDINFAVLPPEVNSARIFAGAGLGPMLAAASAWDGLAEELHAAAGSFASVTT
GLAGDAWHGPASLAMTRAASPYVWLNNTAAGQAAQAAGQARLAASAFEATLAATVSPAMVAANR
TRLASLVAANLLGQNAPATAAAEAQEYEQIWAQDVAAAMFGYHSAASAVATQLAPIQEGLOQQQLQN
VLAQLASGNLGSNGVGNIGNDNIGNANIGFNGRDNANIGIGNIGDRNLGIGNTGNWNIGIGI
TGNGQIGFGKPANPDVLLVVGNGGPGVTALVMGGTDSLPLPNIPLLEYAARFITPVHPGYTATF
LETPSQFFPFTGLNSLTYDVSVAQGVTLNHTAIMAQLAAGNEVVVFGTSQSATIATFEMRYLOS
LPAHLRPGLELSFTLTGNPNRPDGGILTRFGFSIPQLGFTLSGATPADAYPTVDYAFQYDGVN
DFPKYPLNVFATANAIAGILFLHSGLIALLPPDLASGVVQPVSSPDVLTYYILLPSQDLPLLVPL
RAIPLLGNPLADLIQPDRLRVLVELGYDRTAHQDVPSPFGLFPDWDVAEVAADLQQGAVQGVNDA
LSGLGLPPPWPALPRLFST

Слитый полипептид ID93 (SEQ ID NO: 2)

MTINYQFGDVAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTA
DFWGGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMAQTDSAVGSSWAGTHLANGSMSEVMMSEIAGLPIPPIIHYG
AIAYAPSGASGKAHQRTPARAEQVALEKCGDKTCKVVSFRTRCGAVAYNGSKYQGGTGLTRRA
AEDDAVNRLEGGRIWNWACNELMTRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISG
AGWSGMAEATSLDTMTQMNQAFRNIWNMLHGVRDGLVRDANNYEQQEQASQQILSSVDINFAVL
PPEVNSARIFAGAGLGPMLAAASAWDGLAEELHAAAGSFASVTTGLAGDAWHGPASLAMTRAAS
PYVWLNNTAAGQAAQAAGQARLAASAFEATLAATVSPAMVAANRTRLASLVAANLLGQNAPATA

AAEAEYEQIWAQDVAAMFGYHSAASAVATQLAPIQEGLQQQLQNVLAQLASGNLGSNGVGVGNI
GNDNIGNANIGFGNRGDANIGIGNIGDRNLGIGNTGWNIGIGITGNGQIGFGKPANPDVLLVVG
NGGPGVTALVMGGTDSLPLPLNIPLELYAARFITPVHPGYTATFLETSPQFFPFTGLNSLTYDV
SVAQGVNTLHTAIMAQLAAGNEVVVFGTSQSAT IATFEMRYLQSLPAHLRPGLDELSFTLTGNP
NRPDGGILTFRGFSIPQLGFTLSGATPADAYPTVDYAFQYDGVNDFPKYPLNVFATANAIAGIL
FLHSGLIALLPPDLASGVVQPVSSPDVLTYYILLPSQDLPLLVPLRAIPLLGPNLADLIQPDRLV
LVELGYDRTAHQDVSPFGLFPDWDWAEVAADLQQGAVQGVNDALSGLGLPPPWPALPRLFST

Слитый полипептид ID83 с необязательной His-меткой (SEQ ID NO: 3)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGTHLANGSMSEVMSEIAGLP I P P I I H Y G A I A Y A P S G A
SGKAWHQRTPARAEQVALEKCKGDKTKCVVSRFTRCGAVAYNGSKYQGGTGLTRRAAEDDAVNRL
EGGRIVNWACNELMTRSFMTPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAGWSGMAEA
TSLDTMTQMNQAFRNI V N M L H G V R D G L V R D A N N Y E Q Q E Q A S Q Q I L S S V D I N F A V L P P E V N S A R I
FAGAGLGPM L A A A S A W D G L A E E L H A A A G S F A S V T T G L A G D A W H G P A S L A M T R A A S P Y V G W L N T A
A G Q A A Q A A G Q A R L A A S A F E A T L A A T V S P A M V A A N R T R L A S L V A A N L L G Q N A P A I A A A E A E Y E Q I
WAQDVAAMFGYHSAASAVATQLAPIQEGLQQQLQNVLAQLASGNLGSNGVGVGNI GNDNIGNAN
IGFGNRGDANIGIGNIGDRNLGIGNTGWNIGIGITGNGQIGFGKPANPDVLLVVGNGGPGVTAL
VMGGTDSLPLPLNIPLELYAARFITPVHPGYTATFLETSPQFFPFTGLNSLTYDVSVAQGVNTL
HTAIMAQLAAGNEVVVFGTSQSAT IATFEMRYLQSLPAHLRPGLDELSFTLTGNPNRDPGGILT
FRGFSIPQLGFTLSGATPADAYPTVDYAFQYDGVNDFPKYPLNVFATANAIAGILFLHSGLIALL
PPDLASGVVQPVSSPDVLTYYILLPSQDLPLLVPLRAIPLLGPNLADLIQPDRLV LVELGYDRT
AHQDVSPFGLFPDWDWAEVAADLQQGAVQGVNDALSGLGLPPPWPALPRLFST

Слитый полипептид ID83 (SEQ ID NO: 4)

HLANGSMSEVMSEIAGLP I P P I I H Y G A I A Y A P S G A S G K A W H Q R T P A R A E Q V A L E K C G D
KTKCVVSRFTRCGAVAYNGSKYQGGTGLTRRAAEDDAVNRL EGGRIVNWACNELMTRSFMTPH
AMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAGWSGMAEATSLDTMTQMNQAFRNI V N M L H G V
RDGLVRDANNYEQEQASQQILSSVDINFAVL P P E V N S A R I F A G A G L G P M L A A A S A W D G L A E E L
H A A A G S F A S V T T G L A G D A W H G P A S L A M T R A A S P Y V G W L N T A A G Q A A Q A A G Q A R L A A S A F E A T L A
A T V S P A M V A A N R T R L A S L V A A N L L G Q N A P A I A A A E A E Y E Q I W A Q D V A A M F G Y H S A A S A V A T Q L A
P I Q E G L Q Q Q L Q N V L A Q L A S G N L G S G N V G V G N I G N D N I G N A N I G F G N R G D A N I G I G N I G D R N L G I
G N T G N W N I G I G I T G N G Q I G F G K P A N P D V L V V G N G G P G V T A L V M G G T D S L P L P N I P L L E Y A A R F
I T P V H P G Y T A T F L E T S P Q F F P F T G L N S L T Y D V S V A Q G V N T L H T A I M A Q L A A G N E V V V F G T S Q S A
T I A T F E M R Y L Q S L P A H L R P G L D E L S F T L T G N P N R P D G G I L T R F G F S I P Q L G F T L S G A T P A D A Y P
T V D Y A F Q Y D G V N D F P K Y P L N V F A T A N A I A G I L F L H S G L I A L P P D L A S G V V Q P V S S P D V L T T Y I L
L P S Q D L P L L V P L R A I P L L G N P L A D L I Q P D R L V L V E L G Y D R T A H Q D V S P F G L F P D W D W A E V A A D
L Q Q G A V Q G V N D A L S G L G L P P P W P A L P R L F S T

Rv1813 (SEQ NO: 5)

MITNLRRRTAMAAAGLGAALGLGILLVPTVDAHLANGSMSEVMMSEIAGLPIPPIIHYG
AIAYAPSGASGKAHQRTPARAEQVALEKCGDKTCKVVSFRFTRCGAVAYNGSKYQGGTGLTRRA
AEDDAVNRLEGGRIVNWACN

Rv3620 (SEQ ID NO: 6)

MTSRFMTDPHAMRDMAGRFEVHAQTVEDEARRMWASAQNISGAGWSGMAEATSLDTMTQ
MNQAFRNIVNMLHGVRDGLVLDANNYEQQEQASQQILSS

Rv2608 (SEQ ID NO: 7)

MNFAVLPPEVNSARIFAGAGLGPMLAAASAWDGLAEELHAAAGSFASVTTGLAGDAWHG
PASLAMTRAASPYVGWLNNTAAGQAAQAGQARLAASA FEATLAATVSPAMVAANRTRLASLVAA
NLLGQNAPAIAAAEEYEQIWAQDVAAMFGYHSAASAVATQLAPIQEGLQQQLQNVLAQLASGN
LGSGNVGVGNIGNDNIGNANIGFGNRGDANIGIGNIGDRNLGIGNTGNNWIGIGITGNGQIGFG
KPANPDVLVVGNGGPGVTALVMGGTDSLLPLPNIPLEAARFIPVHPGYTATFLETSPQFFP
FTGLNSLTYDVSVAQGVNLTHTAIMAQLAAGNEVVVFQTSQSATIAATFEMRYLQSLPAHLRPL
DELSFTLTGNPNRPDGGILTRFGFSIPQLGFTLSGATPADAYPTVDYAFQYDGVNDFPKYPLNV
FATANAIAGILFLHSGLIALLPDLASGVVQPVSSPDVLTYYIILLPSQDLPLLPLRAIPLGNP
LADLIQPDRLVLEVELGYDRTAHQDVPSFGLFPDWDVAEVAADLQQGAVQGVNDALSGLGLPPP
WQPALPRLF

Rv3619 (SEQ ID NO: 8)

MTINYQFGDVDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTA SDFWGGAGSAACQGFITQLGR
NFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMAQTDSAVGSSWA

Список последовательностей.

<110> INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE
 FOX, Christopher B.
 VEDVICK, Thomas S.
 BARNES, Lucien
 KRAMER, Ryan M.
 REED, Steven G.

<120> ОДНОФЛАКОННЫЕ ВАКЦИННЫЕ СОСТАВЫ

<130> 712192003040

<140> PCT/US2014/072615

<141> 2014-12-29

<150> US 61/922,761

<151> 2013-12-31

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 911

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 1

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1                               10                    15
Arg Gly Ser His Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala
 20                               25                    30
His Gly Ala Met Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His
 35                               40                    45
Gln Ala Ile Ile Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly
 50                               55                    60
Ala Gly Ser Ala Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn
 65                               70                    75                    80
Phe Gln Val Ile Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln
 85                               90                    95
Ala Ala Gly Asn Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser
 100                              105                   110
Trp Ala Gly Thr His Leu Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met
 115                              120                   125

```

041309

Ser Glu Ile Ala Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala
 130 135 140
 Ile Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg
 145 150 155 160
 Thr Pro Ala Arg Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys
 165 170 175
 Thr Cys Lys Val Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr
 180 185 190
 Asn Gly Ser Lys Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala
 195 200 205
 Glu Asp Asp Ala Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp
 210 215 220
 Ala Cys Asn Glu Leu Met Thr Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala
 225 230 235 240
 Met Arg Asp Met Ala Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu
 245 250 255
 Asp Glu Ala Arg Arg Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala
 260 265 270
 Gly Trp Ser Gly Met Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Gln
 275 280 285
 Met Asn Gln Ala Phe Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg
 290 295 300
 Asp Gly Leu Val Arg Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ser Gln Gln Ile Leu Ser Ser Val Asp Ile Asn Phe Ala Val Leu Pro
 325 330 335
 Pro Glu Val Asn Ser Ala Arg Ile Phe Ala Gly Ala Gly Leu Gly Pro
 340 345 350
 Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp Asp Gly Leu Ala Glu Glu Leu His
 355 360 365
 Ala Ala Ala Gly Ser Phe Ala Ser Val Thr Thr Gly Leu Ala Gly Asp
 370 375 380
 Ala Trp His Gly Pro Ala Ser Leu Ala Met Thr Arg Ala Ala Ser Pro
 385 390 395 400
 Tyr Val Gly Trp Leu Asn Thr Ala Ala Gly Gln Ala Ala Gln Ala Ala
 405 410 415
 Gly Gln Ala Arg Leu Ala Ala Ser Ala Phe Glu Ala Thr Leu Ala Ala
 420 425 430
 Thr Val Ser Pro Ala Met Val Ala Ala Asn Arg Thr Arg Leu Ala Ser
 435 440 445
 Leu Val Ala Ala Asn Leu Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala
 450 455 460
 Ala Glu Ala Glu Tyr Glu Gln Ile Trp Ala Gln Asp Val Ala Ala Met
 465 470 475 480
 Phe Gly Tyr His Ser Ala Ala Ser Ala Val Ala Thr Gln Leu Ala Pro
 485 490 495
 Ile Gln Glu Gly Leu Gln Gln Gln Leu Gln Asn Val Leu Ala Gln Leu
 500 505 510
 Ala Ser Gly Asn Leu Gly Ser Gly Asn Val Gly Val Gly Asn Ile Gly
 515 520 525
 Asn Asp Asn Ile Gly Asn Ala Asn Ile Gly Phe Gly Asn Arg Gly Asp
 530 535 540

041309

Ala Asn Ile Gly Ile Gly Asn Ile Gly Asp Arg Asn Leu Gly Ile Gly
 545 550 555 560
 Asn Thr Gly Asn Trp Asn Ile Gly Ile Gly Ile Thr Gly Asn Gly Gln
 565 570 575
 Ile Gly Phe Gly Lys Pro Ala Asn Pro Asp Val Leu Val Val Gly Asn
 580 585 590
 Gly Gly Pro Gly Val Thr Ala Leu Val Met Gly Gly Thr Asp Ser Leu
 595 600 605
 Leu Pro Leu Pro Asn Ile Pro Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Arg Phe Ile
 610 615 620
 Thr Pro Val His Pro Gly Tyr Thr Ala Thr Phe Leu Glu Thr Pro Ser
 625 630 635
 Gln Phe Phe Pro Phe Thr Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Asp Val Ser
 645 650 655
 Val Ala Gln Gly Val Thr Asn Leu His Thr Ala Ile Met Ala Gln Leu
 660 665 670
 Ala Ala Gly Asn Glu Val Val Val Phe Gly Thr Ser Gln Ser Ala Thr
 675 680 685
 Ile Ala Thr Phe Glu Met Arg Tyr Leu Gln Ser Leu Pro Ala His Leu
 690 695 700
 Arg Pro Gly Leu Asp Glu Leu Ser Phe Thr Leu Thr Gly Asn Pro Asn
 705 710 715
 Arg Pro Asp Gly Gly Ile Leu Thr Arg Phe Gly Phe Ser Ile Pro Gln
 725 730 735
 Leu Gly Phe Thr Leu Ser Gly Ala Thr Pro Ala Asp Ala Tyr Pro Thr
 740 745 750
 Val Asp Tyr Ala Phe Gln Tyr Asp Gly Val Asn Asp Phe Pro Lys Tyr
 755 760 765
 Pro Leu Asn Val Phe Ala Thr Ala Asn Ala Ile Ala Gly Ile Leu Phe
 770 775 780
 Leu His Ser Gly Leu Ile Ala Leu Pro Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val
 785 790 795
 Val Gln Pro Val Ser Ser Pro Asp Val Leu Thr Thr Tyr Ile Leu Leu
 805 810 815
 Pro Ser Gln Asp Leu Pro Leu Leu Val Pro Leu Arg Ala Ile Pro Leu
 820 825 830
 Leu Gly Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ile Gln Pro Asp Leu Arg Val Leu
 835 840 845
 Val Glu Leu Gly Tyr Asp Arg Thr Ala His Gln Asp Val Pro Ser Pro
 850 855 860
 Phe Gly Leu Phe Pro Asp Val Asp Trp Ala Glu Val Ala Ala Asp Leu
 865 870 875 880
 Gln Gln Gly Ala Val Gln Gly Val Asn Asp Ala Leu Ser Gly Leu Gly
 885 890 895
 Leu Pro Pro Pro Trp Gln Pro Ala Leu Pro Arg Leu Phe Ser Thr
 900 905 910

<210> 2

<211> 891

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

041309

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 2

```

Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met
 1           5           10          15
Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Ile
 20           25           30
Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Ala
 35           40           45
Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile
 50           55           60
Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
 65           70           75           80
Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala Gly Thr
 85           90           95
His Leu Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala
 100          105          110
Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala
 115          120          125
Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg
 130          135          140
Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val
 145          150          155          160
Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys
 165          170          175
Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala
 180          185          190
Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn Glu
 195          200          205
Leu Met Thr Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met
 210          215          220
Ala Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg
 225          230          235          240
Arg Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly
 245          250          255
Met Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Gln Met Asn Gln Ala
 260          265          270
Phe Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val
 275          280          285
Arg Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Ala Ser Gln Gln Ile
 290          295          300
Leu Ser Ser Val Asp Ile Asn Phe Ala Val Leu Pro Pro Glu Val Asn
 305          310          315          320
Ser Ala Arg Ile Phe Ala Gly Ala Gly Leu Gly Pro Met Leu Ala Ala
 325          330          335
Ala Ser Ala Trp Asp Gly Leu Ala Glu Glu Leu His Ala Ala Ala Gly
 340          345          350
Ser Phe Ala Ser Val Thr Thr Gly Leu Ala Gly Asp Ala Trp His Gly
 355          360          365
Pro Ala Ser Leu Ala Met Thr Arg Ala Ala Ser Pro Tyr Val Gly Trp

```

041309

370 375 380
 Leu Asn Thr Ala Ala Gly Gln Ala Ala Gln Ala Ala Gly Gln Ala Arg
 385 390 395 400
 Leu Ala Ala Ser Ala Phe Glu Ala Thr Leu Ala Ala Thr Val Ser Pro
 405 410 415
 Ala Met Val Ala Ala Asn Arg Thr Arg Leu Ala Ser Leu Val Ala Ala
 420 425 430
 Asn Leu Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ala Glu Ala Glu
 435 440 445
 Tyr Glu Gln Ile Trp Ala Gln Asp Val Ala Ala Met Phe Gly Tyr His
 450 455 460
 Ser Ala Ala Ser Ala Val Ala Thr Gln Leu Ala Pro Ile Gln Glu Gly
 465 470 475 480
 Leu Gln Gln Gln Leu Gln Asn Val Leu Ala Gln Leu Ala Ser Gly Asn
 485 490 495
 Leu Gly Ser Gly Asn Val Gly Val Gly Asn Ile Gly Asn Asp Asn Ile
 500 505 510
 Gly Asn Ala Asn Ile Gly Phe Gly Asn Arg Gly Asp Ala Asn Ile Gly
 515 520 525
 Ile Gly Asn Ile Gly Asp Arg Asn Leu Gly Ile Gly Asn Thr Gly Asn
 530 535 540
 Trp Asn Ile Gly Ile Gly Ile Thr Gly Asn Gly Gln Ile Gly Phe Gly
 545 550 555 560
 Lys Pro Ala Asn Pro Asp Val Leu Val Val Gly Asn Gly Gly Pro Gly
 565 570 575
 Val Thr Ala Leu Val Met Gly Gly Thr Asp Ser Leu Leu Pro Leu Pro
 580 585 590
 Asn Ile Pro Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Arg Phe Ile Thr Pro Val His
 595 600 605
 Pro Gly Tyr Thr Ala Thr Phe Leu Glu Thr Pro Ser Gln Phe Phe Pro
 610 615 620
 Phe Thr Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Asp Val Ser Val Ala Gln Gly
 625 630 635 640
 Val Thr Asn Leu His Thr Ala Ile Met Ala Gln Leu Ala Ala Gly Asn
 645 650 655
 Glu Val Val Val Phe Gly Thr Ser Gln Ser Ala Thr Ile Ala Thr Phe
 660 665 670
 Glu Met Arg Tyr Leu Gln Ser Leu Pro Ala His Leu Arg Pro Gly Leu
 675 680 685
 Asp Glu Leu Ser Phe Thr Leu Thr Gly Asn Pro Asn Arg Pro Asp Gly
 690 695 700
 Gly Ile Leu Thr Arg Phe Gly Phe Ser Ile Pro Gln Leu Gly Phe Thr
 705 710 715 720
 Leu Ser Gly Ala Thr Pro Ala Asp Ala Tyr Pro Thr Val Asp Tyr Ala
 725 730 735
 Phe Gln Tyr Asp Gly Val Asn Asp Phe Pro Lys Tyr Pro Leu Asn Val
 740 745 750
 Phe Ala Thr Ala Asn Ala Ile Ala Gly Ile Leu Phe Leu His Ser Gly
 755 760 765
 Leu Ile Ala Leu Pro Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Val Gln Pro Val
 770 775 780
 Ser Ser Pro Asp Val Leu Thr Thr Tyr Ile Leu Leu Pro Ser Gln Asp

041309

Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu Ser Ser Val Asp Ile Asn Phe Ala
 225 230 235 240
 Val Leu Pro Pro Glu Val Asn Ser Ala Arg Ile Phe Ala Gly Ala Gly
 245 250 255
 Leu Gly Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp Asp Gly Leu Ala Glu
 260 265 270
 Glu Leu His Ala Ala Ala Gly Ser Phe Ala Ser Val Thr Thr Gly Leu
 275 280 285
 Ala Gly Asp Ala Trp His Gly Pro Ala Ser Leu Ala Met Thr Arg Ala
 290 295 300
 Ala Ser Pro Tyr Val Gly Trp Leu Asn Thr Ala Ala Gly Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Gln Ala Ala Gly Gln Ala Arg Leu Ala Ala Ser Ala Phe Glu Ala Thr
 325 330 335
 Leu Ala Ala Thr Val Ser Pro Ala Met Val Ala Ala Asn Arg Thr Arg
 340 345 350
 Leu Ala Ser Leu Val Ala Ala Asn Leu Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala
 355 360 365
 Ile Ala Ala Ala Glu Ala Glu Tyr Glu Gln Ile Trp Ala Gln Asp Val
 370 375 380
 Ala Ala Met Phe Gly Tyr His Ser Ala Ala Ser Ala Val Ala Thr Gln
 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Ile Gln Glu Gly Leu Gln Gln Gln Leu Gln Asn Val Leu
 405 410 415
 Ala Gln Leu Ala Ser Gly Asn Leu Gly Ser Gly Asn Val Gly Val Gly
 420 425 430
 Asn Ile Gly Asn Asp Asn Ile Gly Asn Ala Asn Ile Gly Phe Gly Asn
 435 440 445
 Arg Gly Asp Ala Asn Ile Gly Ile Gly Asn Ile Gly Asp Arg Asn Leu
 450 455 460
 Gly Ile Gly Asn Thr Gly Asn Trp Asn Ile Gly Ile Gly Ile Thr Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Gln Ile Gly Phe Gly Lys Pro Ala Asn Pro Asp Val Leu Val
 485 490 495
 Val Gly Asn Gly Gly Pro Gly Val Thr Ala Leu Val Met Gly Gly Thr
 500 505 510
 Asp Ser Leu Leu Pro Leu Pro Asn Ile Pro Leu Leu Glu Tyr Ala Ala
 515 520 525
 Arg Phe Ile Thr Pro Val His Pro Gly Tyr Thr Ala Thr Phe Leu Glu
 530 535 540
 Thr Pro Ser Gln Phe Phe Pro Phe Thr Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr
 545 550 555 560
 Asp Val Ser Val Ala Gln Gly Val Thr Asn Leu His Thr Ala Ile Met
 565 570 575
 Ala Gln Leu Ala Ala Gly Asn Glu Val Val Val Phe Gly Thr Ser Gln
 580 585 590
 Ser Ala Thr Ile Ala Thr Phe Glu Met Arg Tyr Leu Gln Ser Leu Pro
 595 600 605
 Ala His Leu Arg Pro Gly Leu Asp Glu Leu Ser Phe Thr Leu Thr Gly
 610 615 620
 Asn Pro Asn Arg Pro Asp Gly Gly Ile Leu Thr Arg Phe Gly Phe Ser
 625 630 635 640

041309

Ile Pro Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ser Gly Ala Thr Pro Ala Asp Ala
 Tyr Pro Thr Val Asp Tyr Ala Phe Gln Tyr Asp Gly Val Asn Asp Phe
 Pro Lys Tyr Pro Leu Asn Val Phe Ala Thr Ala Asn Ala Ile Ala Gly
 Ile Leu Phe Leu His Ser Gly Leu Ile Ala Leu Pro Pro Asp Leu Ala
 Ser Gly Val Val Gln Pro Val Ser Ser Pro Asp Val Leu Thr Thr Tyr
 Ile Leu Leu Pro Ser Gln Asp Leu Pro Leu Leu Val Pro Leu Arg Ala
 Ile Pro Leu Leu Gly Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ile Gln Pro Asp Leu
 Arg Val Leu Val Glu Leu Gly Tyr Asp Arg Thr Ala His Gln Asp Val
 Pro Ser Pro Phe Gly Leu Phe Pro Asp Val Asp Trp Ala Glu Val Ala
 Ala Asp Leu Gln Gln Gly Ala Val Gln Gly Val Asn Asp Ala Leu Ser
 Gly Leu Gly Leu Pro Pro Pro Trp Gln Pro Ala Leu Pro Arg Leu Phe
 Ser Thr

<210> 4
 <211> 795
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 4
 His Leu Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala
 Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala
 Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg
 Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val
 Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys
 Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala
 Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn Glu
 Leu Met Thr Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met
 Ala Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg

041309

130 135 140
 Arg Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly
 145 150 155 160
 Met Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Gln Met Asn Gln Ala
 165 170 175
 Phe Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val
 180 185 190
 Arg Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Asp Ile Asn Phe Ala Val Leu Pro Pro Glu Val Asn
 210 215 220
 Ser Ala Arg Ile Phe Ala Gly Ala Gly Leu Gly Pro Met Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Ser Ala Trp Asp Gly Leu Ala Glu Glu Leu His Ala Ala Ala Gly
 245 250 255
 Ser Phe Ala Ser Val Thr Thr Gly Leu Ala Gly Asp Ala Trp His Gly
 260 265 270
 Pro Ala Ser Leu Ala Met Thr Arg Ala Ala Ser Pro Tyr Val Gly Trp
 275 280 285
 Leu Asn Thr Ala Ala Gly Gln Ala Ala Gln Ala Ala Gly Gln Ala Arg
 290 295 300
 Leu Ala Ala Ser Ala Phe Glu Ala Thr Leu Ala Ala Thr Val Ser Pro
 305 310 315 320
 Ala Met Val Ala Ala Asn Arg Thr Arg Leu Ala Ser Leu Val Ala Ala
 325 330 335
 Asn Leu Leu Gly Gln Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ala Glu Ala Glu
 340 345 350
 Tyr Glu Gln Ile Trp Ala Gln Asp Val Ala Ala Met Phe Gly Tyr His
 355 360 365
 Ser Ala Ala Ser Ala Val Ala Thr Gln Leu Ala Pro Ile Gln Glu Gly
 370 375 380
 Leu Gln Gln Gln Leu Gln Asn Val Leu Ala Gln Leu Ala Ser Gly Asn
 385 390 395 400
 Leu Gly Ser Gly Asn Val Gly Val Gly Asn Ile Gly Asn Asp Asn Ile
 405 410 415
 Gly Asn Ala Asn Ile Gly Phe Gly Asn Arg Gly Asp Ala Asn Ile Gly
 420 425 430
 Ile Gly Asn Ile Gly Asp Arg Asn Leu Gly Ile Gly Asn Thr Gly Asn
 435 440 445
 Trp Asn Ile Gly Ile Gly Ile Thr Gly Asn Gly Gln Ile Gly Phe Gly
 450 455 460
 Lys Pro Ala Asn Pro Asp Val Leu Val Val Gly Asn Gly Gly Pro Gly
 465 470 475 480
 Val Thr Ala Leu Val Met Gly Gly Thr Asp Ser Leu Leu Pro Leu Pro
 485 490 495
 Asn Ile Pro Leu Leu Glu Tyr Ala Ala Arg Phe Ile Thr Pro Val His
 500 505 510
 Pro Gly Tyr Thr Ala Thr Phe Leu Glu Thr Pro Ser Gln Phe Phe Pro
 515 520 525
 Phe Thr Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Asp Val Ser Val Ala Gln Gly
 530 535 540
 Val Thr Asn Leu His Thr Ala Ile Met Ala Gln Leu Ala Ala Gly Asn

041309

545 550 555 560
 Glu Val Val Val Phe Gly Thr Ser Gln Ser Ala Thr Ile Ala Thr Phe
 565 570 575
 Glu Met Arg Tyr Leu Gln Ser Leu Pro Ala His Leu Arg Pro Gly Leu
 580 585 590
 Asp Glu Leu Ser Phe Thr Leu Thr Gly Asn Pro Asn Arg Pro Asp Gly
 595 600 605
 Gly Ile Leu Thr Arg Phe Gly Phe Ser Ile Pro Gln Leu Gly Phe Thr
 610 615 620
 Leu Ser Gly Ala Thr Pro Ala Asp Ala Tyr Pro Thr Val Asp Tyr Ala
 625 630 635 640
 Phe Gln Tyr Asp Gly Val Asn Asp Phe Pro Lys Tyr Pro Leu Asn Val
 645 650 655
 Phe Ala Thr Ala Asn Ala Ile Ala Gly Ile Leu Phe Leu His Ser Gly
 660 665 670
 Leu Ile Ala Leu Pro Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Val Gln Pro Val
 675 680 685
 Ser Ser Pro Asp Val Leu Thr Thr Tyr Ile Leu Leu Pro Ser Gln Asp
 690 695 700
 Leu Pro Leu Leu Val Pro Leu Arg Ala Ile Pro Leu Leu Gly Asn Pro
 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Leu Ile Gln Pro Asp Leu Arg Val Leu Val Glu Leu Gly
 725 730 735
 Tyr Asp Arg Thr Ala His Gln Asp Val Pro Ser Pro Phe Gly Leu Phe
 740 745 750
 Pro Asp Val Asp Trp Ala Glu Val Ala Ala Asp Leu Gln Gln Gly Ala
 755 760 765
 Val Gln Gly Val Asn Asp Ala Leu Ser Gly Leu Gly Leu Pro Pro Pro
 770 775 780
 Trp Gln Pro Ala Leu Pro Arg Leu Phe Ser Thr
 785 790 795

<210> 5
 <211> 143
 <212> BE10K
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 5
 Met Ile Thr Asn Leu Arg Arg Arg Thr Ala Met Ala Ala Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Leu Gly Leu Gly Ile Leu Leu Val Pro Thr Val Asp Ala
 20 25 30
 His Leu Ala Asn Gly Ser Met Ser Glu Val Met Met Ser Glu Ile Ala
 35 40 45
 Gly Leu Pro Ile Pro Pro Ile Ile His Tyr Gly Ala Ile Ala Tyr Ala
 50 55 60
 Pro Ser Gly Ala Ser Gly Lys Ala Trp His Gln Arg Thr Pro Ala Arg
 65 70 75 80
 Ala Glu Gln Val Ala Leu Glu Lys Cys Gly Asp Lys Thr Cys Lys Val
 85 90 95
 Val Ser Arg Phe Thr Arg Cys Gly Ala Val Ala Tyr Asn Gly Ser Lys

041309

Tyr Gln Gly Gly Thr Gly Leu Thr Arg Arg Ala Ala Glu Asp Asp Ala
 100 105 110
 115 120 125
 Val Asn Arg Leu Glu Gly Gly Arg Ile Val Asn Trp Ala Cys Asn
 130 135 140

<210> 6
 <211> 98
 <212> БЕЛОК
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 6
 Met Thr Ser Arg Phe Met Thr Asp Pro His Ala Met Arg Asp Met Ala
 1 5 10 15
 Gly Arg Phe Glu Val His Ala Gln Thr Val Glu Asp Glu Ala Arg Arg
 20 25 30
 Met Trp Ala Ser Ala Gln Asn Ile Ser Gly Ala Gly Trp Ser Gly Met
 35 40 45
 Ala Glu Ala Thr Ser Leu Asp Thr Met Thr Gln Met Asn Gln Ala Phe
 50 55 60
 Arg Asn Ile Val Asn Met Leu His Gly Val Arg Asp Gly Leu Val Arg
 65 70 75 80
 Asp Ala Asn Asn Tyr Glu Gln Gln Glu Gln Ala Ser Gln Gln Ile Leu
 85 90 95
 Ser Ser

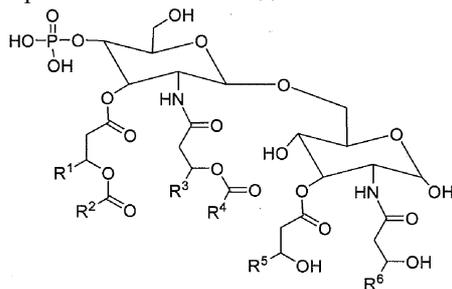
<210> 7
 <211> 580
 <212> БЕЛОК
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 7
 Met Asn Phe Ala Val Leu Pro Pro Glu Val Asn Ser Ala Arg Ile Phe
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gly Leu Gly Pro Met Leu Ala Ala Ala Ser Ala Trp Asp
 20 25 30
 Gly Leu Ala Glu Glu Leu His Ala Ala Ala Gly Ser Phe Ala Ser Val
 35 40 45
 Thr Thr Gly Leu Ala Gly Asp Ala Trp His Gly Pro Ala Ser Leu Ala
 50 55 60
 Met Thr Arg Ala Ala Ser Pro Tyr Val Gly Trp Leu Asn Thr Ala Ala
 65 70 75 80
 Gly Gln Ala Ala Gln Ala Ala Gly Gln Ala Arg Leu Ala Ala Ser Ala
 85 90 95
 Phe Glu Ala Thr Leu Ala Ala Thr Val Ser Pro Ala Met Val Ala Ala
 100 105 110
 Asn Arg Thr Arg Leu Ala Ser Leu Val Ala Ala Asn Leu Leu Gly Gln
 115 120 125
 Asn Ala Pro Ala Ile Ala Ala Ala Glu Ala Glu Tyr Glu Gln Ile Trp

041309

130 135 140
 Ala Gln Asp Val Ala Ala Met Phe Gly Tyr His Ser Ala Ala Ser Ala
 145 150 155 160
 Val Ala Thr Gln Leu Ala Pro Ile Gln Glu Gly Leu Gln Gln Gln Leu
 165 170 175
 Gln Asn Val Leu Ala Gln Leu Ala Ser Gly Asn Leu Gly Ser Gly Asn
 180 185 190
 Val Gly Val Gly Asn Ile Gly Asn Asp Asn Ile Gly Asn Ala Asn Ile
 195 200 205
 Gly Phe Gly Asn Arg Gly Asp Ala Asn Ile Gly Ile Gly Asn Ile Gly
 210 215 220
 Asp Arg Asn Leu Gly Ile Gly Asn Thr Gly Asn Trp Asn Ile Gly Ile
 225 230 235 240
 Gly Ile Thr Gly Asn Gly Gln Ile Gly Phe Gly Lys Pro Ala Asn Pro
 245 250 255
 Asp Val Leu Val Val Gly Asn Gly Gly Pro Gly Val Thr Ala Leu Val
 260 265 270
 Met Gly Gly Thr Asp Ser Leu Leu Pro Leu Pro Asn Ile Pro Leu Leu
 275 280 285
 Glu Tyr Ala Ala Arg Phe Ile Thr Pro Val His Pro Gly Tyr Thr Ala
 290 295 300
 Thr Phe Leu Glu Thr Pro Ser Gln Phe Phe Pro Phe Thr Gly Leu Asn
 305 310 315 320
 Ser Leu Thr Tyr Asp Val Ser Val Ala Gln Gly Val Thr Asn Leu His
 325 330 335
 Thr Ala Ile Met Ala Gln Leu Ala Ala Gly Asn Glu Val Val Val Phe
 340 345 350
 Gly Thr Ser Gln Ser Ala Thr Ile Ala Thr Phe Glu Met Arg Tyr Leu
 355 360 365
 Gln Ser Leu Pro Ala His Leu Arg Pro Gly Leu Asp Glu Leu Ser Phe
 370 375 380
 Thr Leu Thr Gly Asn Pro Asn Arg Pro Asp Gly Gly Ile Leu Thr Arg
 385 390 395 400
 Phe Gly Phe Ser Ile Pro Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ser Gly Ala Thr
 405 410 415
 Pro Ala Asp Ala Tyr Pro Thr Val Asp Tyr Ala Phe Gln Tyr Asp Gly
 420 425 430
 Val Asn Asp Phe Pro Lys Tyr Pro Leu Asn Val Phe Ala Thr Ala Asn
 435 440 445
 Ala Ile Ala Gly Ile Leu Phe Leu His Ser Gly Leu Ile Ala Leu Pro
 450 455 460
 Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Val Gln Pro Val Ser Ser Pro Asp Val
 465 470 475 480
 Leu Thr Thr Tyr Ile Leu Leu Pro Ser Gln Asp Leu Pro Leu Leu Val
 485 490 495
 Pro Leu Arg Ala Ile Pro Leu Leu Gly Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ile
 500 505 510
 Gln Pro Asp Leu Arg Val Leu Val Glu Leu Gly Tyr Asp Arg Thr Ala
 515 520 525
 His Gln Asp Val Pro Ser Pro Phe Gly Leu Phe Pro Asp Val Asp Trp
 530 535 540
 Ala Glu Val Ala Ala Asp Leu Gln Gln Gly Ala Val Gln Gly Val Asn

10. Композиция по п.9, в которой синтетический адъювант GLA имеет следующую структуру:



где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил.

11. Композиция по п.10,

где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и

R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

12. Композиция по любому из пп.5-11, которая не содержит липосом.

13. Композиция по любому из пп.1-12, где метаболизируемое масло представляет собой сквален, синтетический сквален, масло из семян винограда, оливковое масло или синтетический изопреноид.

14. Композиция по любому из пп.1-13, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой лактозу.

15. Композиция по любому из пп.1-13, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы и сахарозы.

16. Композиция по любому из пп.1-13, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и где формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу, которая имеет концентрацию приблизительно 10% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

17. Композиция по любому из пп.1-13, где композиция образована лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и где формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу, которая имеет концентрацию приблизительно 5% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

18. Композиция по любому из пп.1-13, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде", где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы, где маннит в составе эмульсии типа "масло в воде" находится в концентрации приблизительно 0,1% (мас./об.) и трегалоза в составе эмульсии типа "масло в воде" находится в концентрации приблизительно 5% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

19. Композиция по любому из пп.1-13, где композиция образована лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде", где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы и где маннит в составе эмульсии типа "масло в воде" находится в концентрации приблизительно 2,5% (мас./об.) и трегалоза в составе эмульсии типа "масло в воде" находится в концентрации приблизительно 2,5% (мас./об.).

20. Композиция по любому из пп.1-19, где композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

21. Композиция по п.20, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 3 месяцев.

22. Композиция по п.20, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 6 месяцев.

23. Композиция по п.20, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев.

24. Композиция по п.20, где композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

25. Композиция по п.20, где композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

26. Композиция по п.20, где композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

27. Композиция по любому из пп.1-26, где композиция имеет форму лепешки привлекательного вида.

28. Композиция по любому из пп.1-26, где композиция имеет форму лепешки, которая не проявляет покоричневения при визуальном исследовании при хранении в любых условиях по пп.20-26.

29. Композиция по любому из пп.1-28, где термостабильность композиции определяют перед восстановлением лиофилизированной композиции.

30. Композиция по п.29, где композиция имеет форму лепешки и где термостабильность определяют путем визуального исследования лепешки в отношении сморщивания, растрескивания и/или поко-

ричневения.

31. Композиция по любому из пп.1-28, где термостабильность определяют после восстановления лиофилизированной композиции.

32. Композиция по п.31, где термостабильность определяют путем визуального исследования эмульсии типа "масло в воде", образовавшейся при восстановлении лиофилизированной композиции, в отношении расслоения.

33. Композиция по любому из пп.1-28, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и где концентрация антигена или адьюванта в эмульсии типа "масло в воде", образовавшейся при восстановлении лиофилизированной композиции, проявляет не более чем или приблизительно 25% снижение относительно концентрации антигена или адьюванта состава эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

34. Композиция по любому из пп.1-28, где термостабильность определяют с использованием анализа компонентов эмульсии типа "масло в воде", образовавшейся при восстановлении лиофилизированной композиции.

35. Композиция по любому из пп.1-28, где эмульсия типа "масло в воде", образовавшаяся при восстановлении лиофилизированной композиции, имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм.

36. Композиция по любому из пп.1-35, дополнительно содержащая 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин-3-фосфохолин (POPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), яичный фосфатидилхолин (PC), лецитин, полисорбатное поверхностно-активное вещество или их комбинацию.

37. Композиция по любому из пп.1-36, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество.

38. Композиция по п.37, где поверхностно-активное вещество представляет собой полоксомер 188.

39. Композиция по любому из пп.1-38, дополнительно содержащая антиоксидант.

40. Композиция по п.39, где антиоксидант представляет собой витамин E.

41. Флакон, содержащий композицию по любому из пп.1-40.

42. Способ хранения композиции, включающий хранение композиции по любому из пп.1-40 при от приблизительно 25°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца, где композиция является термостабильной.

43. Способ получения термостабильной лиофилизированной композиции по п.1, включающий стадию лиофилизации эмульсии типа "масло в воде" с получением термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции,

где эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией содержит

(1) антиген;

(2) метаболизируемое масло; и

(3) формирующий лепешку эксципиент, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой

(a) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы и сахарозы; или

(b) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы и лактозы, и

где вакцинная композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении, причем состав в форме эмульсии типа "масло в воде" не содержит глицерин.

44. Способ по п.43, в котором антиген представляет собой полипептид, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, или патоген.

45. Способ по п.43 или 44, в котором эмульсия "масло в воде" дополнительно содержит адьювант.

46. Способ получения термостабильной лиофилизированной композиции по п.5, включающий стадию лиофилизации эмульсии типа "масло в воде" с получением термостабильной лиофилизированной вакцинной композиции,

где эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией содержит

(1) адьювант;

(2) метаболизируемое масло; и

(3) формирующий лепешку эксципиент, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой

(a) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы и сахарозы; или

(b) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы и лактозы, и

где вакцинная композиция имеет форму лепешки и формирует эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении, причем состав в форме эмульсии типа "масло в воде" не содержит глицерин.

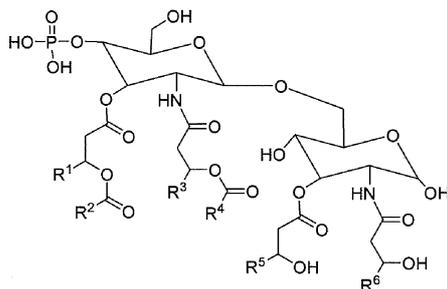
47. Способ по п.46, в котором эмульсия "масло в воде" дополнительно содержит антиген.

48. Способ по п.47, в котором антиген представляет собой полипептид, нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, или патоген.

49. Способ по любому из пп.45-48, в котором адъювант представляет собой агонист TLR4.

50. Способ по п.49, в котором агонист TLR4 представляет собой MPL, 3d-MPL или синтетический глюкопиранозиллипидный адъювант (GLA).

51. Способ по п.50, в котором синтетический адъювант GLA имеет следующую структуру:



где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} - C_{20} -алкил; и R^2 и R^4 представляют собой C_9 - C_{20} -алкил.

52. Способ по п.51,

где R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой C_{11} -алкил; и

R^2 и R^4 представляют собой C_9 -алкил.

53. Способ по любому из пп.43-52, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой лактозу.

54. Способ по любому из пп.43-52, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы и сахарозы.

55. Способ по любому из пп.43-52, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу в концентрации приблизительно 10% (мас./об.) в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

56. Способ по любому из пп.43-52, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу в концентрации приблизительно 5% (мас./об.) в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

57. Способ по любому из пп.43-52, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы и где маннит в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 0,1% (мас./об.) и трегалоза в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 5% (мас./об.).

58. Способ по любому из пп.43-52, где формирующий лепешку эксципиент в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией представляет собой комбинацию маннита и трегалозы и где маннит в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 2,5% (мас./об.) и трегалоза в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией составляет приблизительно 2,5% (мас./об.).

59. Способ по любому из пп.43-58, где композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

60. Способ по п.59, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 3 месяцев.

61. Способ по п.59, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 6 месяцев.

62. Способ по п.59, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев.

63. Способ по п.59, где композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

64. Способ по п.59, где композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

65. Способ по п.59, где композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

66. Способ по любому из пп.43-65, где стадию лиофилизации проводят в едином флаконе.

67. Способ по любому из пп.43-66, где эмульсия типа "масло в воде" при восстановлении имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм.

68. Способ по п.67, где эмульсия типа "масло в воде" при восстановлении имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 100 нм.

69. Способ по любому из пп.43-68 где концентрация антигена и/или адъюванта в эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении проявляет не более чем или приблизительно 25% снижение по сравнению с концентрацией антигена и/или адъюванта в эмульсии типа "масло в воде" перед лиофилизацией.

70. Способ по любому из пп.43-69, где лиофилизированная композиция имеет форму лепешки.

71. Способ по любому из пп.43-66, где термостабильность определяют перед восстановлением лио-

филизированной композиции.

72. Способ по п.71, где лиофилизированная композиция имеет форму лепешки и где термостабильность определяют путем визуального исследования лепешки в отношении сморщивания или покоричневения.

73. Способ по любому из пп.43-70, где термостабильность определяют после восстановления лиофилизированной композиции.

74. Способ по п.73, где термостабильность определяют путем визуального исследования эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении в отношении расслоения.

75. Способ по любому из пп.43-70, где термостабильность определяют визуально.

76. Способ по любому из пп.43-70, где термостабильность определяют посредством анализа компонентов эмульсии типа "масло в воде" при восстановлении.

77. Способ по любому из пп.43-76, где метаболизируемое масло представляет собой сквален, минеральное масло, масло из семян винограда, синтетический сквален или синтетический изопреноид.

78. Способ по любому из пп.43-77, где эмульсия типа "масло в воде" перед лиофилизацией дополнительно содержит 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин-3-фосфохолин (POPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), яичный фосфатидилхолин (PC), лецитин, полисорбатное поверхностно-активное вещество или их комбинацию.

79. Способ по любому из пп.43-78, где композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

80. Способ по п.79, где поверхностно-активное вещество представляет собой полоксимер 188.

81. Способ по любому из пп.43-80, где композиция дополнительно содержит антиоксидант.

82. Способ по п.81, где антиоксидант представляет собой витамин E.

83. Способ стимуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий

(а) восстановление композиции по любому из пп.1-40 в эмульсию типа "масло в воде"; и

(b) введение эмульсии индивидууму, тем самым стимулируя иммунный ответ у индивидуума.

84. Способ по п.83, где иммунный ответ представляет собой неспецифический иммунный ответ.

85. Способ по п.83, где иммунный ответ представляет собой антигенспецифический иммунный ответ.

86. Способ по п.83, где композиция содержит GLA.

87. Способ по п.83, где индивидуум представляет собой млекопитающее.

88. Способ по п.87, где млекопитающее представляет собой человека, собаку или корову.

89. Способ по любому из пп.83-88, где эмульсии вводят внутрикожно или перорально.

90. Термостабильная лиофилизированная композиция для стимуляции иммунного ответа у индивидуума, содержащая метаболизируемое масло и формирующий лепешку эксципиент, где композиция образована лиофилизацией состава в форме эмульсии "масло в воде",

причем лиофилизированная композиция имеет форму лепешки и способна формировать эмульсию типа "масло в воде" при восстановлении,

причем состав в форме эмульсии типа "масло в воде" не содержит глицерин, и

причем формирующий лепешку эксципиент представляет собой

(1) комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы и сахарозы; или

(2) сахарид, выбранный из группы, состоящей из трегалозы и лактозы.

91. Композиция по п.90, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой лактозу.

92. Композиция по п.90, где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и сахара, выбранного из группы, состоящей из трегалозы, декстрозы, лактозы, мальтозы и сахарозы.

93. Композиция по любому из пп.90-92, которая не содержит липосом.

94. Композиция по п.90, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу, которая присутствует в концентрации приблизительно 10% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

95. Композиция по п.90, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде" и формирующий лепешку эксципиент представляет собой трегалозу, которая присутствует в концентрации приблизительно 5% (мас./об.) в составе эмульсии типа "масло в воде".

96. Композиция по п.90, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде", где формирующий лепешку эксципиент представляет собой комбинацию маннита и трегалозы и где маннит в составе эмульсии типа "масло в воде" составляет приблизительно 0,1% (мас./об.) и трегалоза в составе эмульсии типа "масло в воде" составляет приблизительно 5% (мас./об.).

97. Композиция по п.90, где композиция получена лиофилизацией состава эмульсии типа "масло в воде", где формирующий лепешку эксципиент в составе эмульсии типа "масло в воде" представляет собой комбинацию маннита и трегалозы и где маннит в составе эмульсии типа "масло в воде" составляет приблизительно 2,5% (мас./об.) и трегалоза в составе эмульсии типа "масло в воде" составляет приблизительно 2,5% (мас./об.).

98. Композиция по любому из пп.90-97, где композиция является термостабильной при температуре от приблизительно 8°C до приблизительно 60°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

99. Композиция по п.98, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 3 месяцев.

100. Композиция по п.98, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 6 месяцев.

101. Композиция по п.98, где композиция является термостабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев.

102. Композиция по п.98, где композиция является термостабильной при приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

103. Композиция по п.98, где композиция является термостабильной при приблизительно 37°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

104. Композиция по п.98, где композиция является термостабильной при приблизительно 50°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

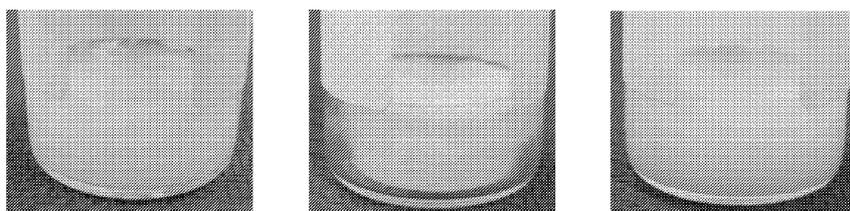
105. Композиция по любому из пп.90-104, где термостабильность определяют перед восстановлением лиофилизированной композиции.

106. Композиция по любому из пп.90-105, где термостабильность определяют при восстановлении лиофилизированной композиции.

107. Композиция по одному из пп.90-105, где эмульсия типа "масло в воде" при восстановлении имеет размер частиц с Z-средним диаметром менее чем приблизительно 200 нм.

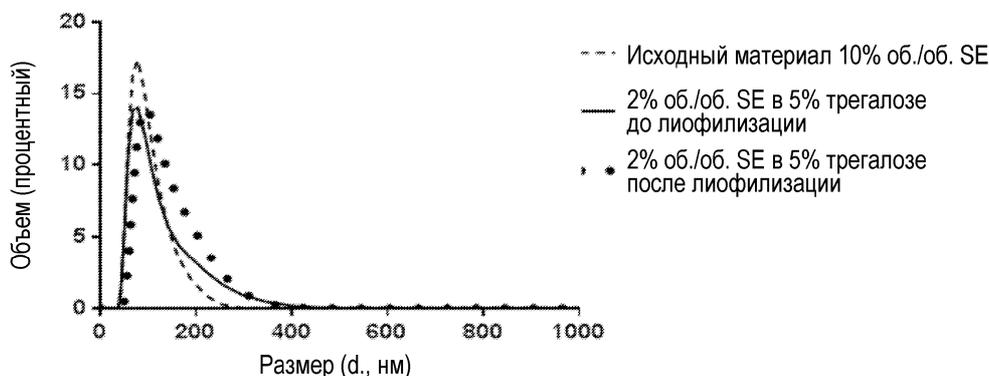
108. Композиция по любому из пп.90-107, дополнительно содержащая адъювант.

109. Композиция по пп.90-108, дополнительно содержащая антиген.

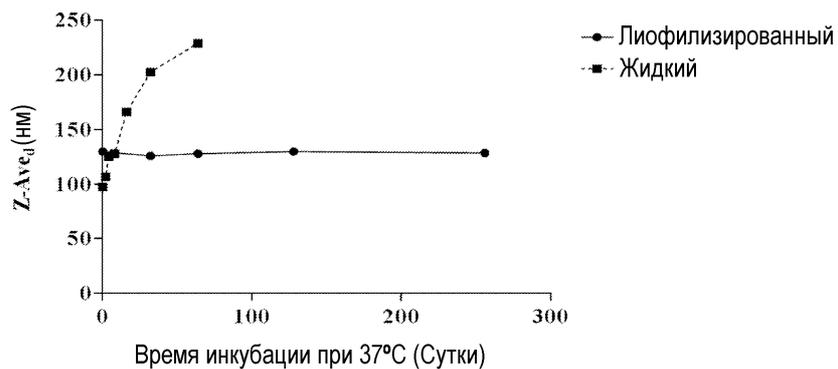
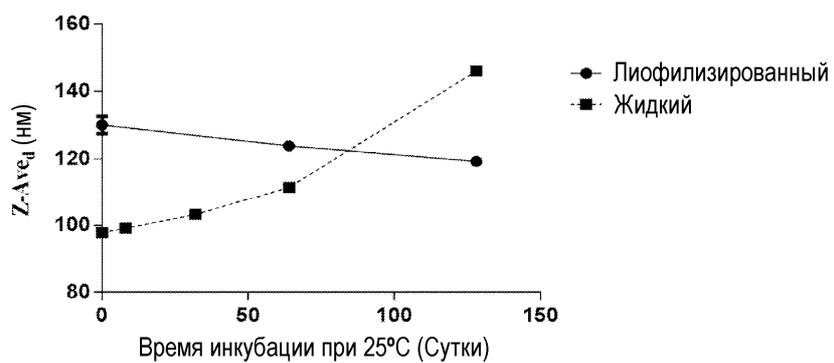


Эмульсия до лиофилизации Лيوфилизированная лепешка Восстановленная эмульсия
2% масляная SE в 5% трегалозе 2% масляная SE в 5% трегалозе 2% масляная SE в 5% трегалозе

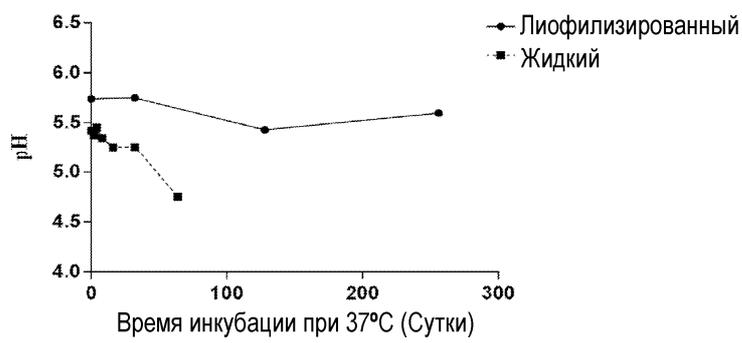
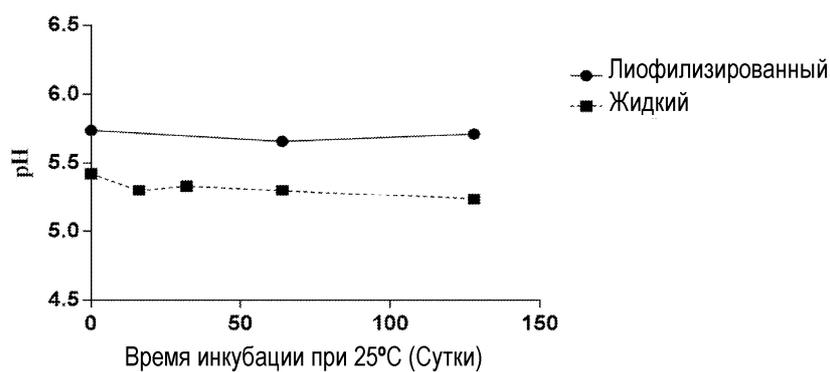
Фиг. 1А



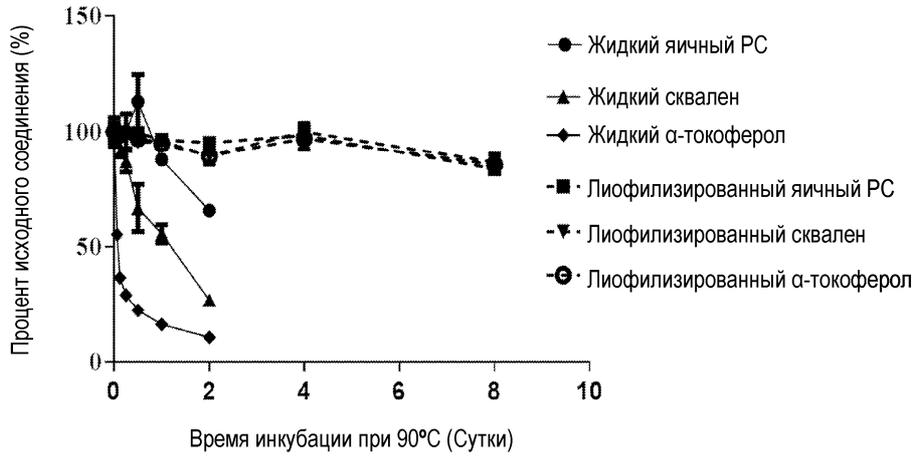
Фиг. 1В



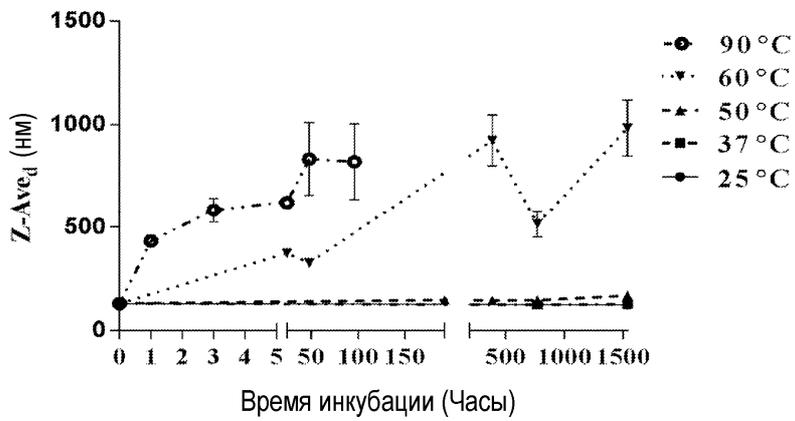
Фиг. 2А



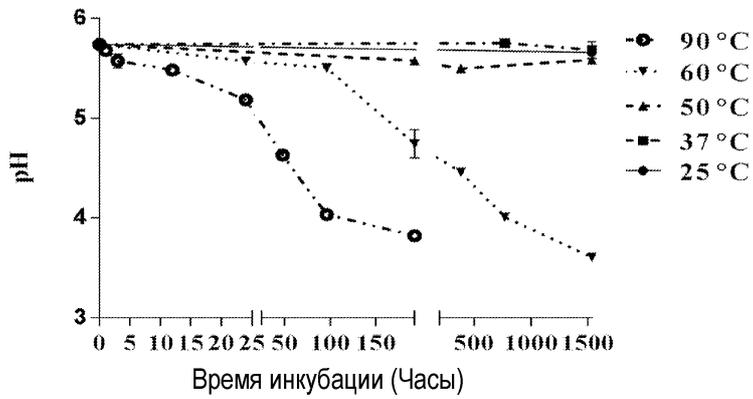
Фиг. 2В



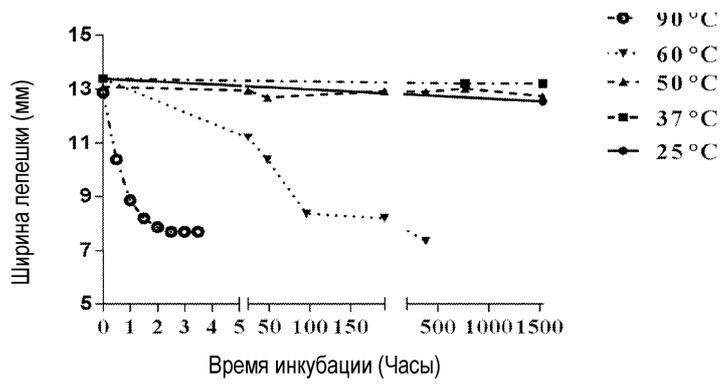
Фиг. 2С



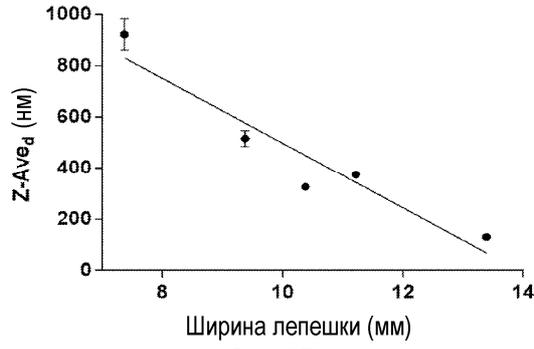
Фиг. 3А



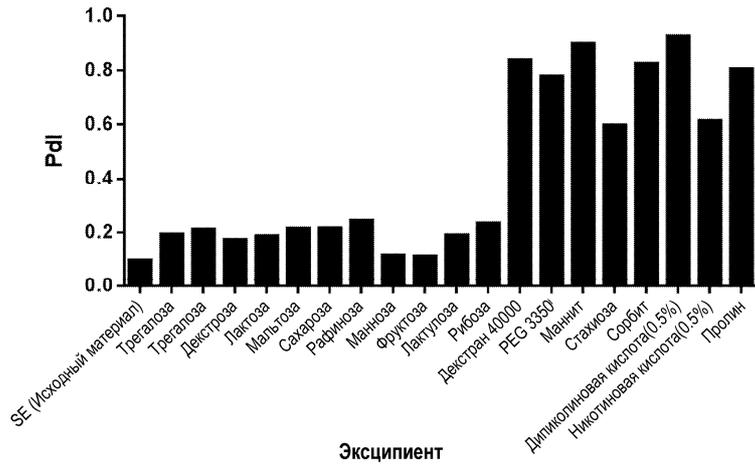
Фиг. 3В



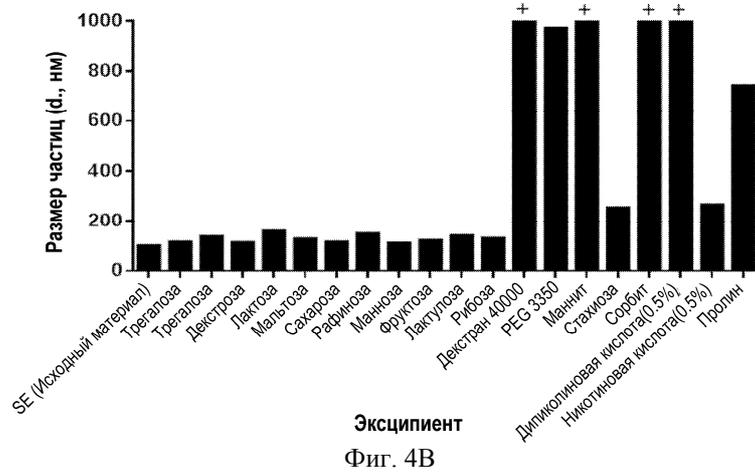
Фиг. 3С



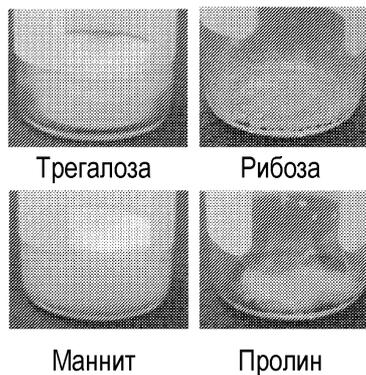
Фиг. 3D



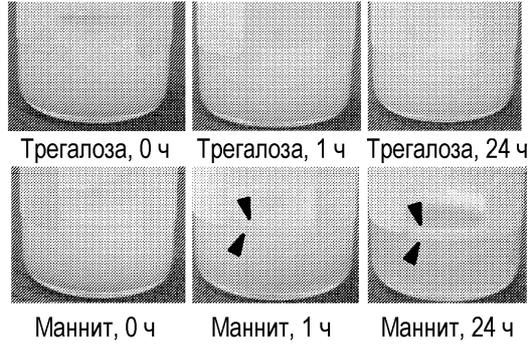
Экципиент
Фиг. 4А



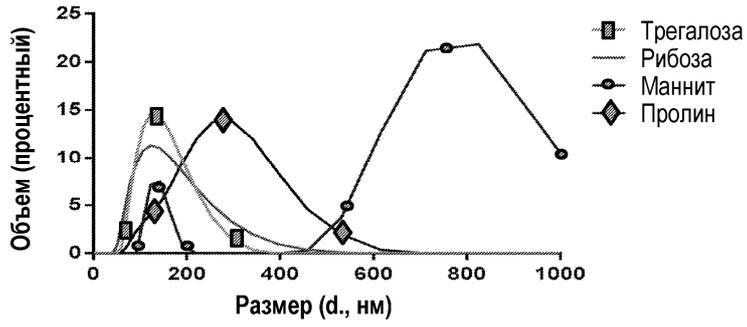
Экципиент
Фиг. 4В



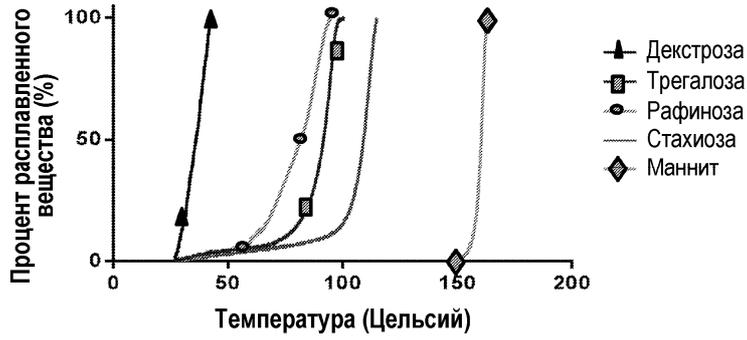
Фиг. 5А



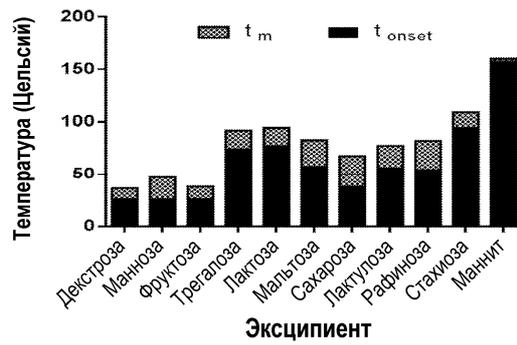
Фиг. 5B



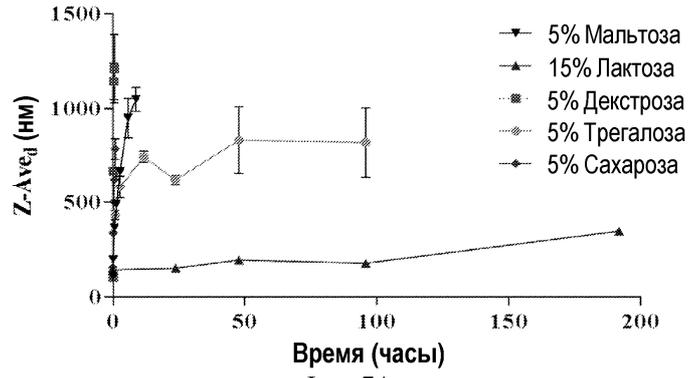
Фиг. 5C



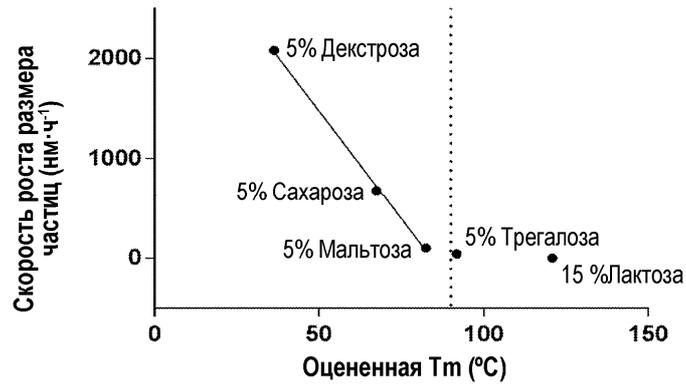
Фиг. 6A



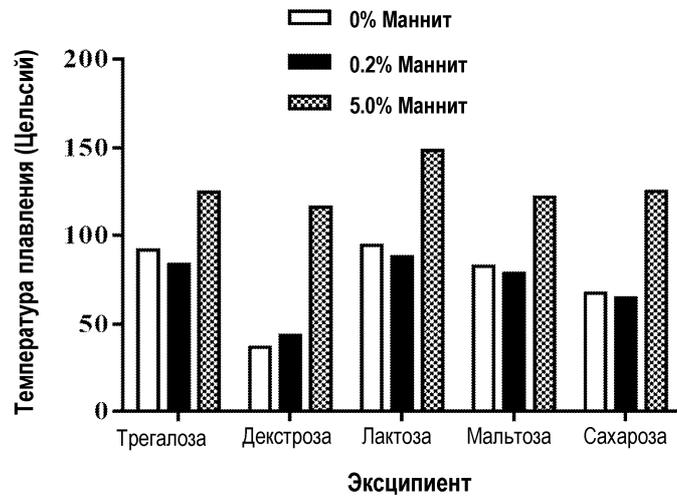
Фиг. 6B



Фиг. 7А



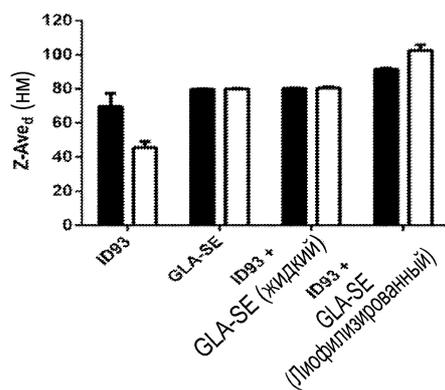
Фиг. 7В



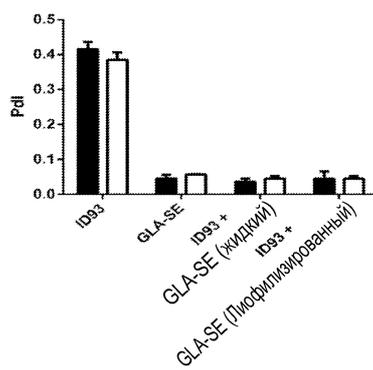
Фиг. 8



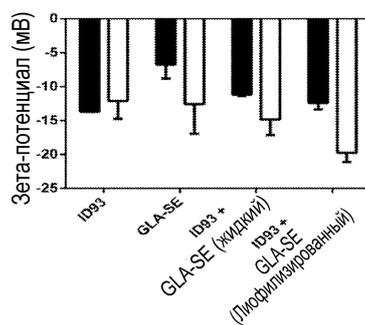
Фиг. 9



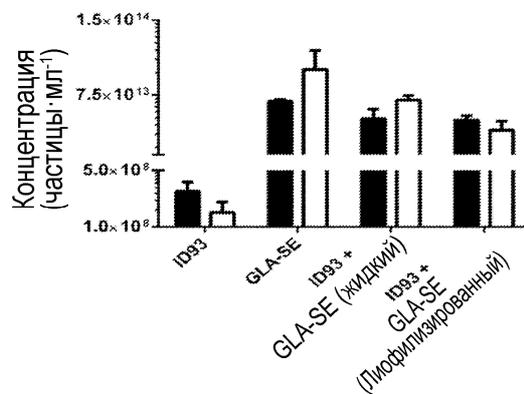
Фиг. 10А



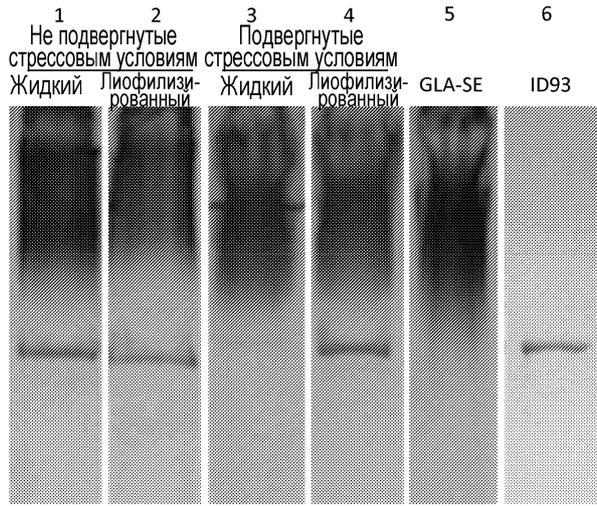
Фиг. 10В



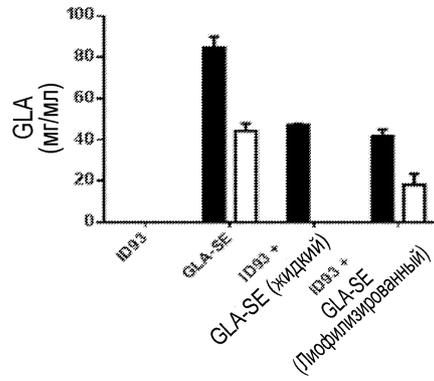
Фиг. 10С



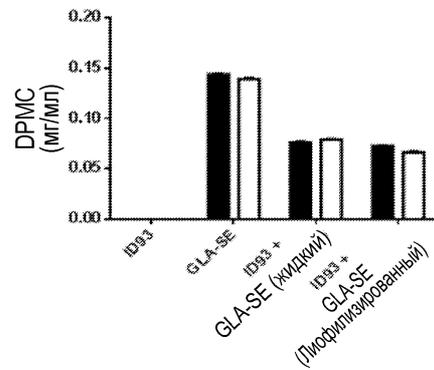
Фиг. 10D



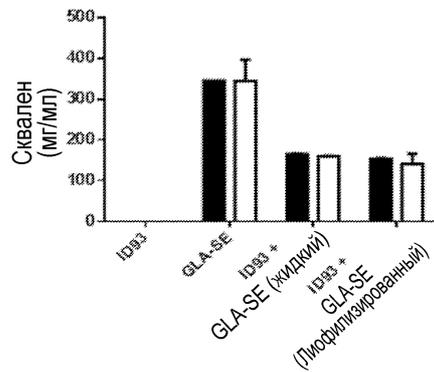
Фиг. 11



Фиг. 12А

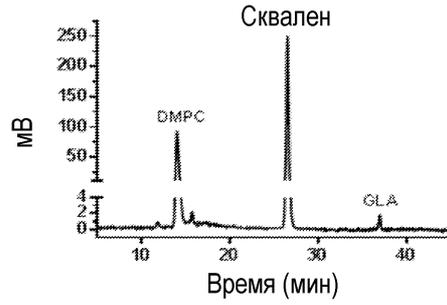


Фиг. 12В

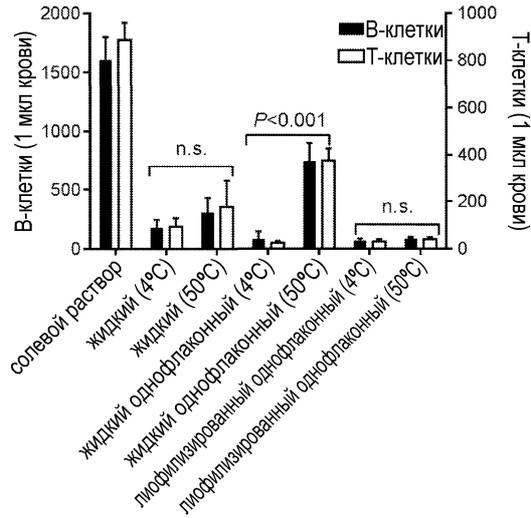


Фиг. 12С

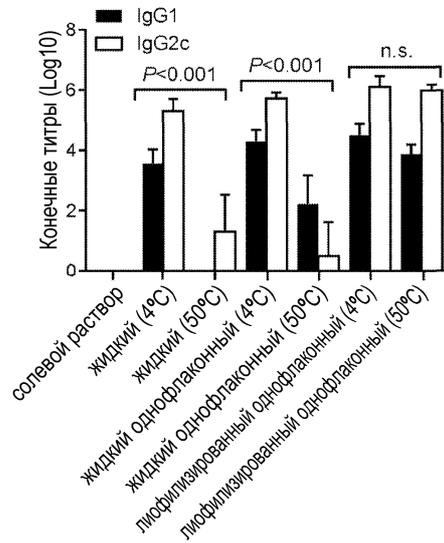
041309



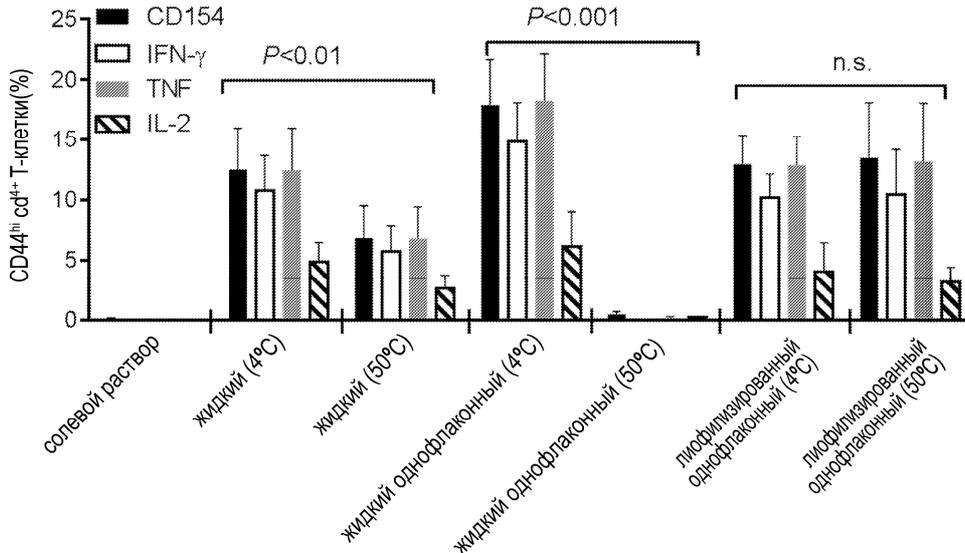
Фиг. 12D



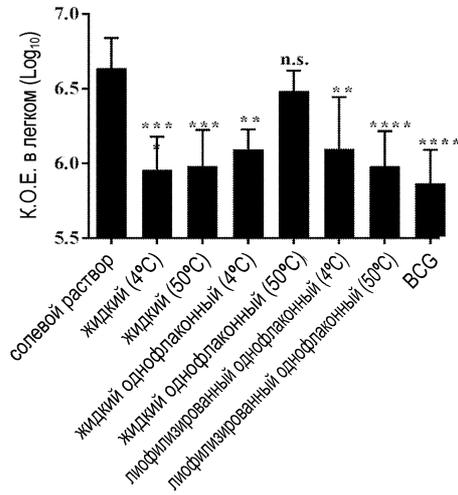
Фиг. 13A



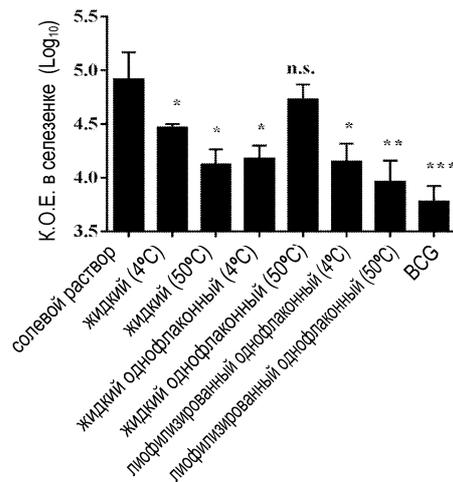
Фиг. 13B



Фиг. 13С



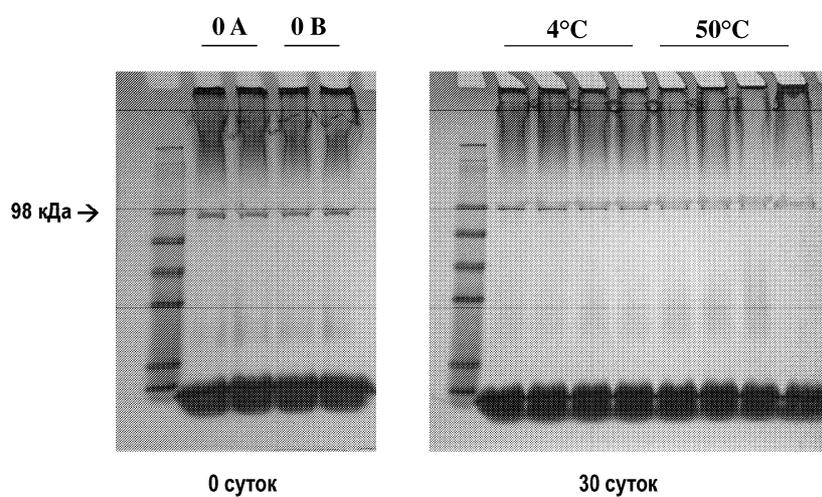
Фиг. 14А



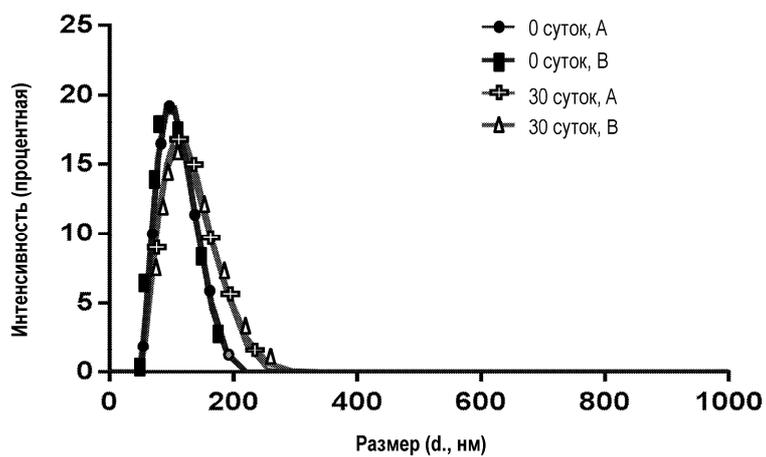
Фиг. 14В

Образец	0 суток, А	0 суток, В	30 суток, А	30 суток, В
Изображение лепешки				
Изображение раствора				
Расслоение (1 Час)	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
Расслоение (24 Часа)	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
рН Раствора	7.47	7.48	7.19	7.19

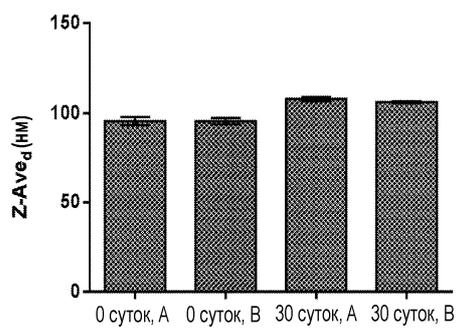
Фиг. 15



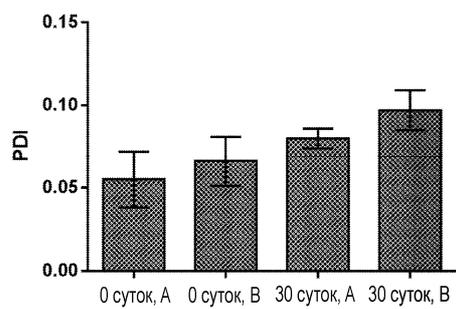
Фиг. 16



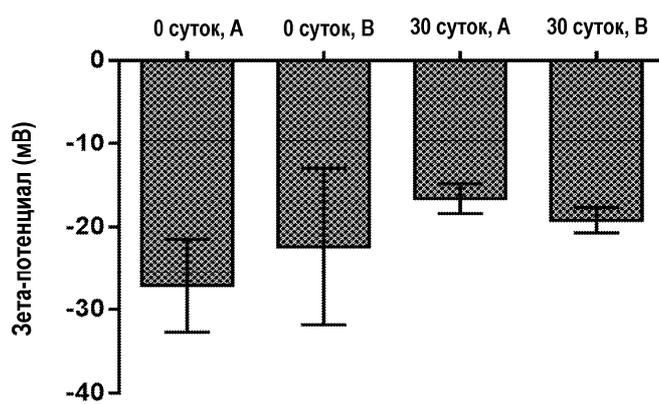
Фиг. 17А



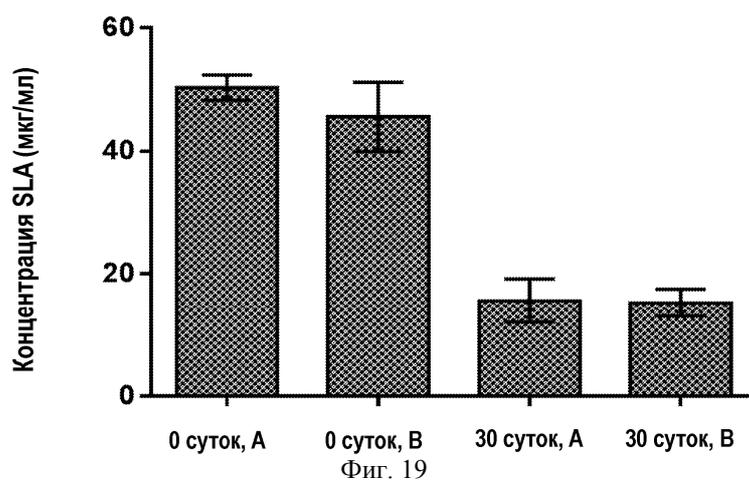
Фиг. 17В



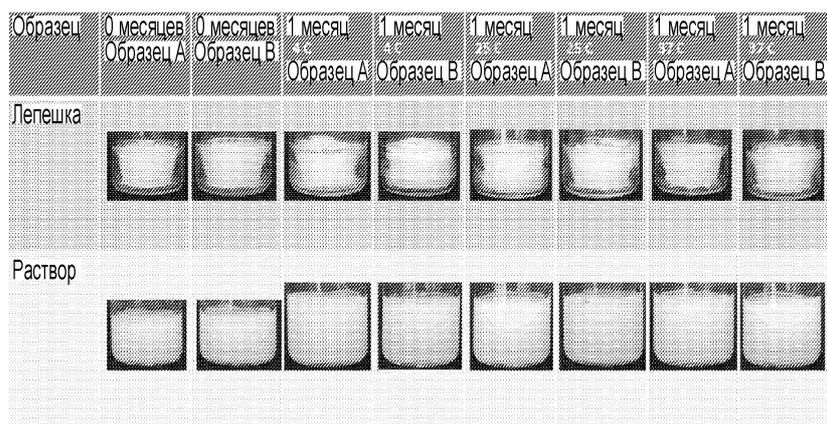
Фиг. 17С



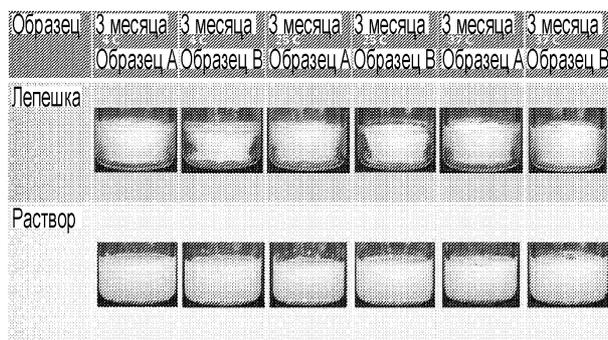
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



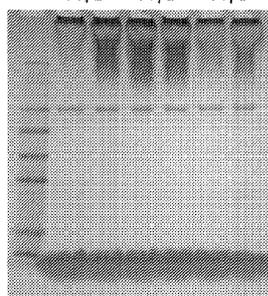
Фиг. 21А

	4 °С	25 °С	37 °С
Лепешка	Pass	Pass	Pass
Расслоение (1 ч)	Neg	Neg	Neg
Расслоение (24 ч)	Neg	Neg	Neg
Z-Aved (нм)	104.9 ± 0.1	105 ± 0.6	117.8 ± 0.2
PDI	0.072 ± 0.008	0.0675 ± 0.0005	0.096 ± 0.05
pH	7.48 ± 0.01	7.46 ± 0.01	7.32 ± 0.01
GLA(мг/мл)	51 ± 2	46 ± 4	42 ± 3

Фиг. 21В

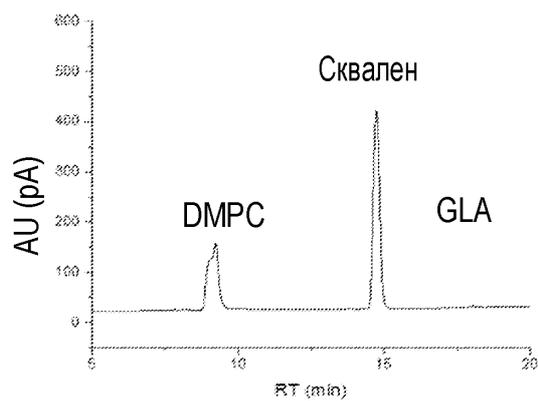
3mo 3mo 3mo
4 C 25 C 37 C
A|B A|B A|B

98 кДа>

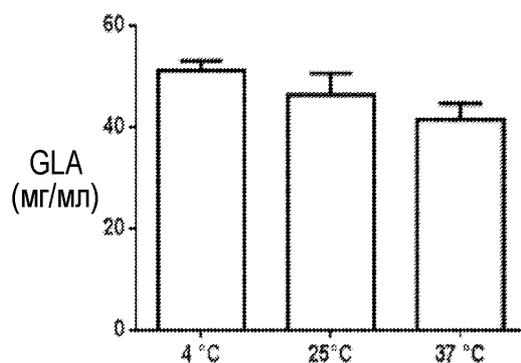


Фиг. 21С

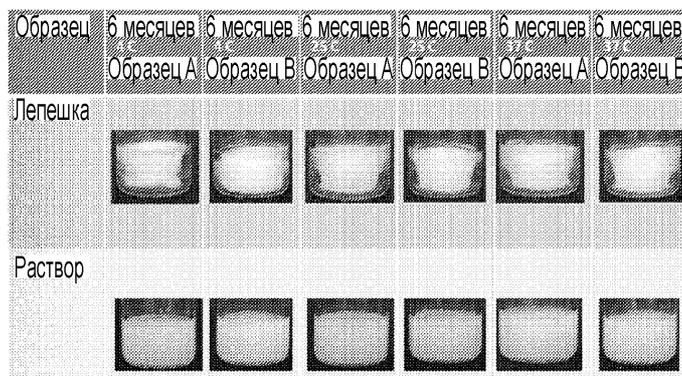
041309



Фиг. 21D



Фиг. 21E



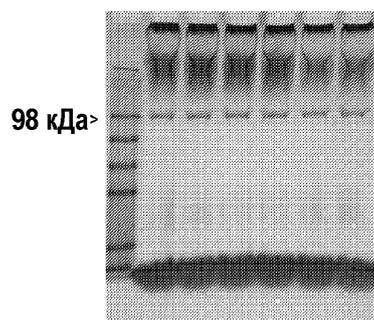
Фиг. 22А

	4 °C	25 °C	37 °C
Лепешка	Pass	Pass	Pass
Расслоение (1 ч)	Neg	Neg	Neg
Расслоение (24 ч)	Neg	Neg	Neg
Z-Aved (нм)	103.4 ± 0.4	103.2 ± 0.1	117.4 ± 0.6
PDI	0.069 ± 0.006	0.0675 ± 0.005	0.10 ± 0.08
pH	7.49 ± 0.00	7.45 ± 0.02	7.21 ± 0.02
GLA(мг/мл)	47 ± 2	42 ± 2	25 ± 2

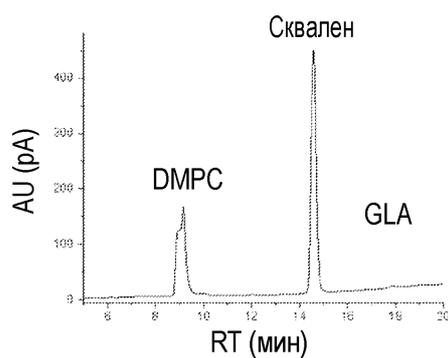
Фиг. 22В

041309

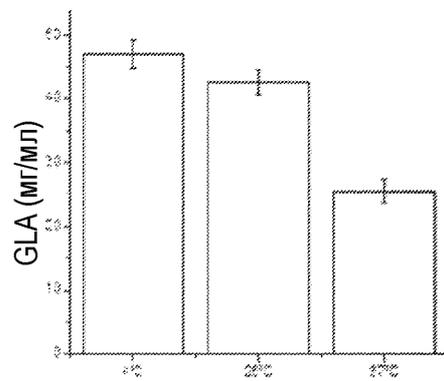
6mo 6mo 6mo
4 C 25 C 37 C
A|B A|B A|B



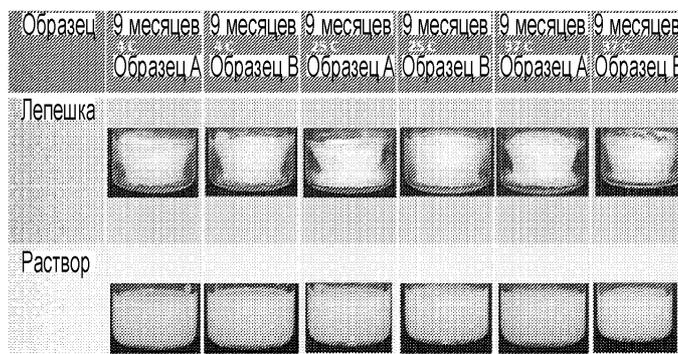
Фиг. 22С



Фиг. 22D



Фиг. 22Е

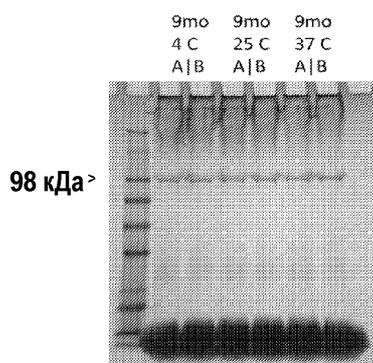


Фиг. 23А

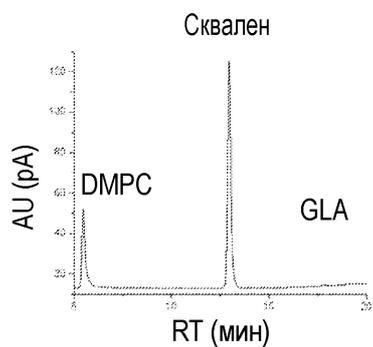
041309

	4 °C	25 °C	37 °C
Лепешка	Pass	Pass	Pass
Восстановление	Pass	Pass	Pass
Расслоение (1 ч)	Neg	Neg	Neg
Расслоение (24 ч)	Neg	Neg	Neg
Z-Aved (нм)	106.3 ± 0.3	105.8 ± 0.5	128 ± 2
PDI	0.060 ± 0.009	0.054 ± 0.005	0.141 ± 0.008
pH	7.525 ± 0.007	7.43 ± 0.04	7.195 ± 0.007
GLA(мг/мл)	40.9 ± 0.4	40 ± 1	15.8 ± 0.9

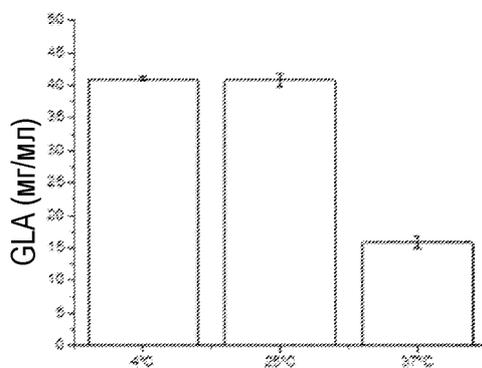
Фиг. 23В



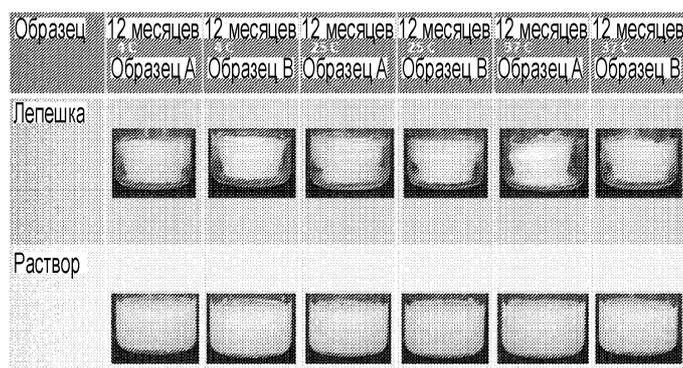
Фиг. 23С



Фиг. 23D



Фиг. 23Е



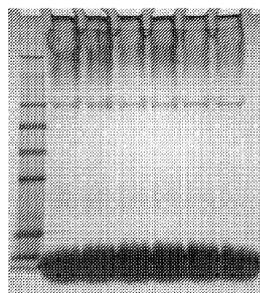
Фиг. 24А

	4 °С	25 °С	37 °С
Лепешка	Pass	Pass	Pass
Расслоение (1 ч)	Neg	Neg	Neg
Расслоение (24 ч)	Neg	Neg	Neg
Z-Aved (нм)	106.6 ± 0.6	109 ± 1	127 ± 2
PDI	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.010	0.134 ± 0.000
pH	7.485 ± 0.007	7.407 ± 0.005	7.155 ± 0.007
GLA(мг/мл)	40.9 ± 0.4	40 ± 1	15.8 ± 0.9

Фиг. 24В

12mo 12mo 12mo
4 C 25 C 37 C
A|B A|B A|B

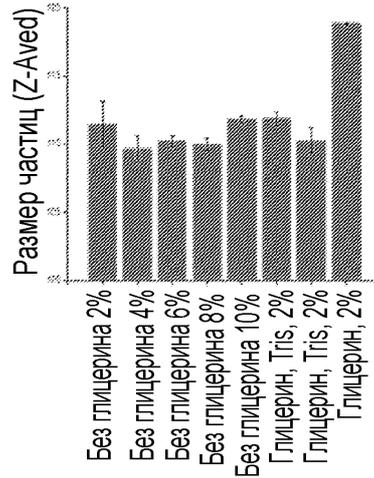
98 кДа >



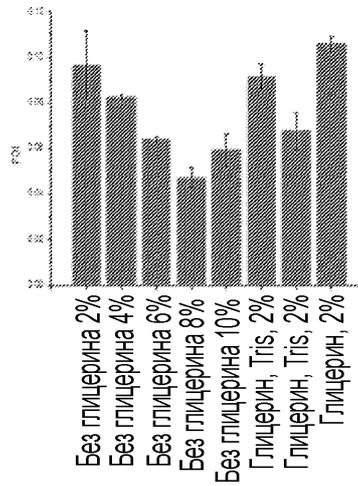
Фиг. 24С

Образец	0 суток		30 суток при 50°С		
Без глицерина 2%			Отрицательный		Отрицательный
Без глицерина 4%			Отрицательный		Отрицательный
Без глицерина 6%			Отрицательный		Отрицательный
Без глицерина 8%			Отрицательный		Отрицательный
Без глицерина 10%			Отрицательный		Отрицательный
С глицерином, Tris, 2%			Отрицательный		Отрицательный
С глицерином, Tris, 2%, объем 1.5 мл			Отрицательный		Отрицательный
С глицерином, 2%			Отрицательный		Отрицательный

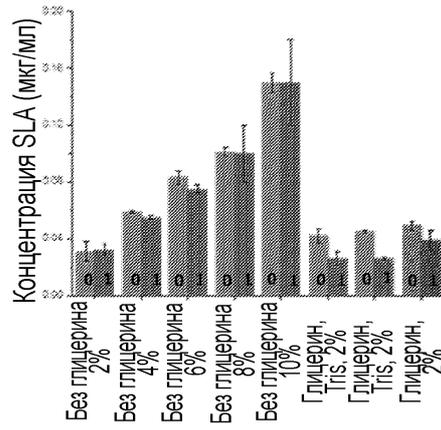
Фиг. 25А



Фиг. 25В



Фиг. 25С



Фиг. 25D

5% w/v Трегалоза

Temp	После	t 0	1 wk	2 wk	1 mo	3 mo
4 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
25 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
37 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
50 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный

Фиг. 26А

5% w/v Трегалоза, 0.1% w/v Маннит

Temp	После	t 0	1 wk	2 wk	1 mo	3 mo
4 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
25 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
37 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
50 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный

Фиг. 26В

2.5% w/v Трегалоза, 2.5% w/v Маннит

Temp	После	t 0	1 wk	2 wk	1 mo	3 mo
4 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
25 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
37 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
50 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный

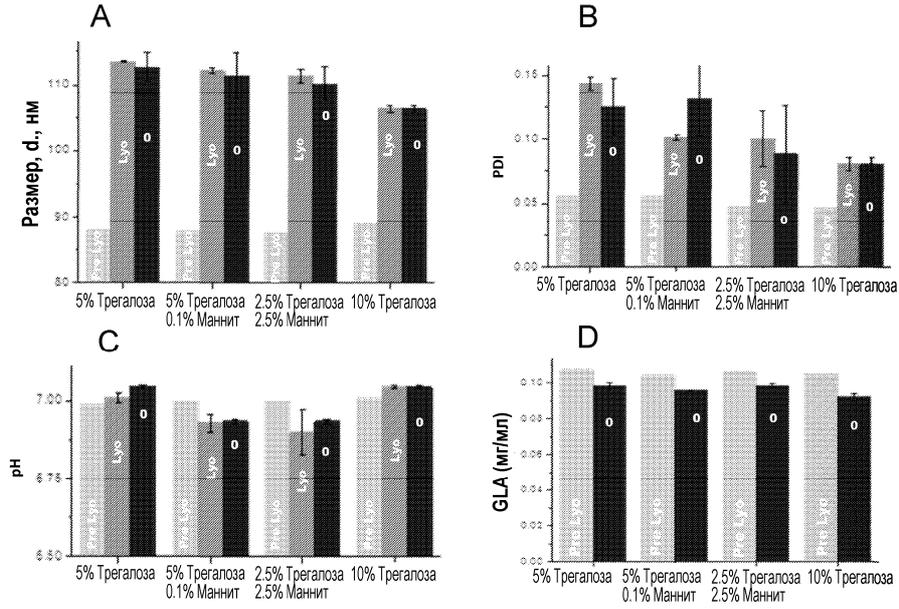
Фиг. 26С

10% w/v Трегалоза

Temp	После	t 0	1 wk	2 wk	1 mo	3 mo
4 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
25 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный		Отрицательный	Отрицательный
37 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
50 ° C						
Расслоение	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный

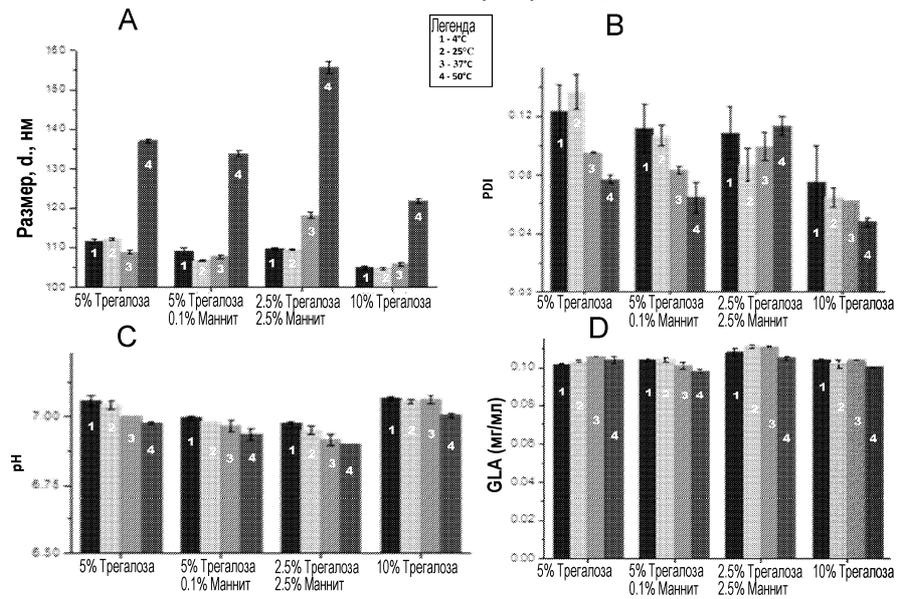
Фиг. 26D

Первоначальная охарактеризация состава



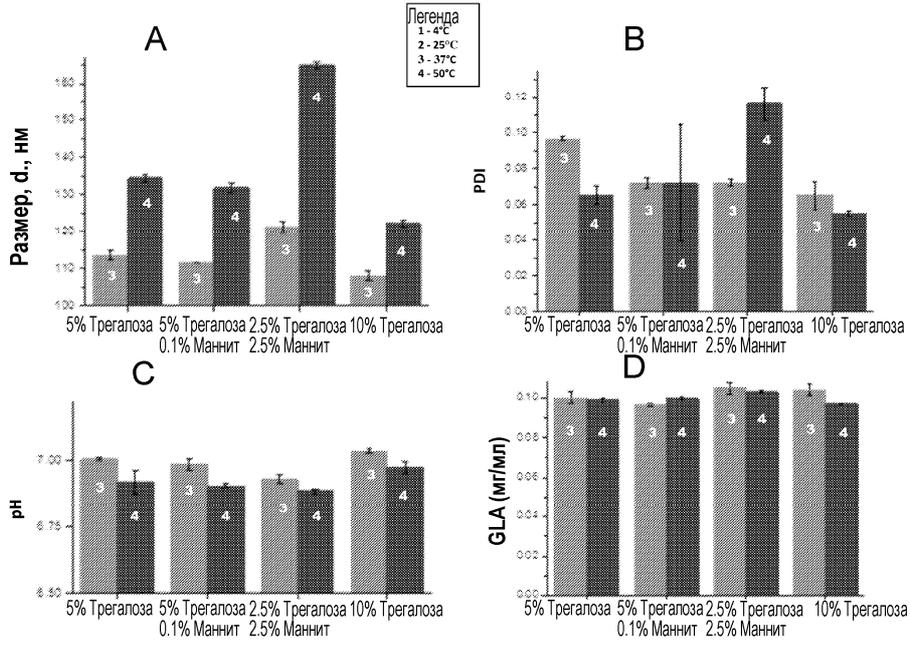
Фиг. 27

Охарактеризация, 1 неделя



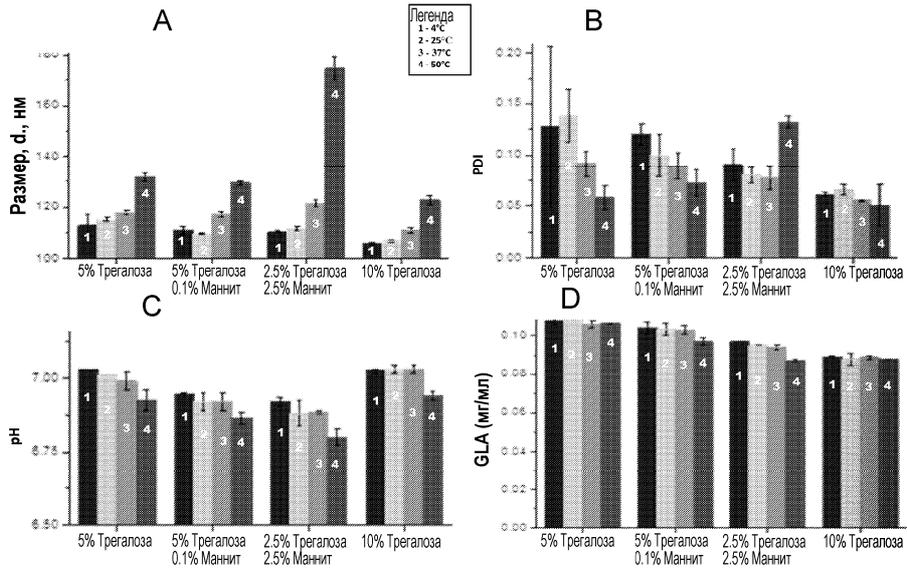
Фиг. 28

Охарактеризация, 2 недели

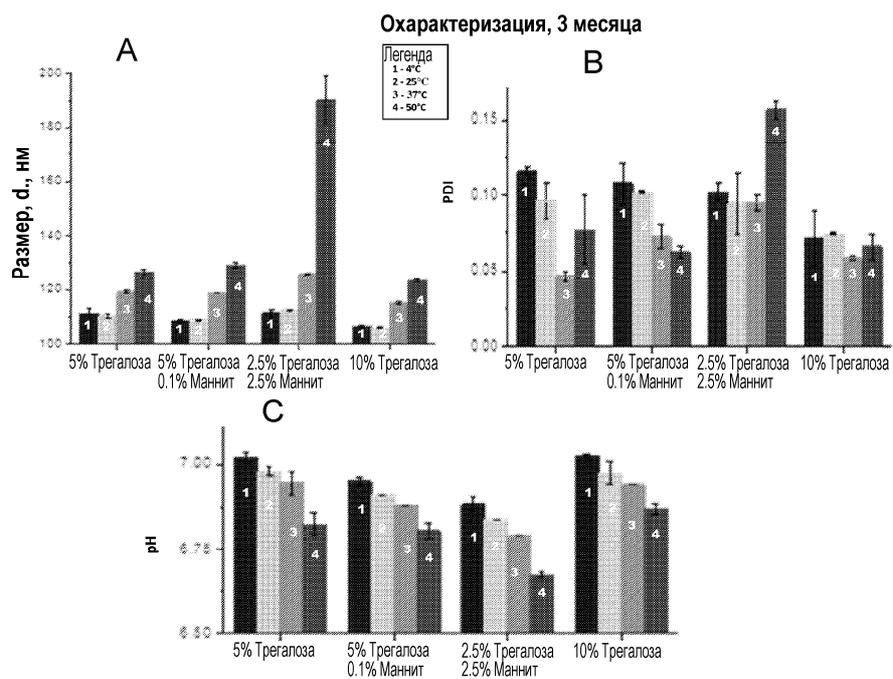


Фиг. 29

Охарактеризация, 4 недели



Фиг. 30



Фиг. 31

