

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042022**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.28

(21) Номер заявки
201991081

(22) Дата подачи заявки
2017.10.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/25* (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУНИТЕТА, СОДЕРЖАЩАЯ ИММУНОМОДУЛЯТОР И КАТИОННУЮ ЛИПОСОМУ, И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ**

(31) **10-2016-0142703; 10-2017-0107420;
10-2017-0107421**

(32) **2016.10.31; 2017.08.24; 2017.08.24**

(33) **KR**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/KR2017/012051**

(87) **WO 2018/080253 2018.05.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЙДЖИН ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:
**Чо Ёан Чи, Ким Квансон, Ли На Кён,
Пак Син Э (KR)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) KR-A-1020120013260
SCHWENDENER, R.A., "Liposomes as Vaccine Delivery Systems: a Review of the Recent Advances", Therapeutic Advances in Vaccines, 2014, vol. 2, no. 6, pages 159-182. See page 161; figure 2; and table 1.

WO-A1-2005039634

WO-A2-0156548

KR-A-1020060117387

KR-A-1020030090897

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для усиления иммунитета, содержащей модулятор иммунного ответа, представленный аналогом липополисахарида (LPS) новой структуры, и катионную липосому. В настоящем изобретении смогли преодолеть физико-химическую нестабильность липосом, и оно дает преимущества в отношении производства, транспортировки и хранения, а также улучшение стабильности, в связи с чем его выгодно использовать в качестве системы иммунной доставки. Дополнительно настоящее изобретение касается вакцинной композиции, содержащей усиливающую иммунитет композицию и антиген. Данная вакцинная композиция проявляет лучшую эффективность усиления иммунитета по сравнению с тем, когда применяется только модулятор иммунных ответов. Также в изобретении предлагаются способы получения усиливающей иммунитет композиции по изобретению и вакцинной композиции по изобретению.

B1

042022

042022

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается композиций для усиления иммунитета, содержащих иммуномодулятор, имеющий новую структуру. В частности, настоящее изобретение касается композиций для усиления иммунитета, содержащих аналог липополисахарида (LPS) с пониженной токсичностью и катионную липосому, а также их применения.

Уровень техники

Липосомы имеют преимущества в том, что они проявляют отличную биосовместимость, их легко получить и они способны доставлять водорастворимые и липидорастворимые лекарственные средства, поэтому активно проводятся исследования таких липосом в качестве системы доставки лекарств, имеющих меньше побочных эффектов *in vivo*. Обычные липосомы имеют недостатки в том, что они вызывают агрегацию, слияние, гидролиз фосфолипидов, окисление, утечку инкапсулированных препаратов и т.п. при хранении липосом в виде дисперсионной фазы в водном растворе, так как сама система физически и химически нестабильна. Таким образом, их недостаток заключается в том, что необходимо обеспечивать стабильность самих липосом при их хранении в течение длительного времени. Для того, чтобы преодолеть эти недостатки, активно проводились исследования по улучшению стабильности липосом путем хранения их в виде мелкого порошка, чтобы преодолеть физико-химическую нестабильность липосом. Однако для превращения липосом в мелкий порошок применяется процесс сублимационной сушки. При таком процессе, когда липосомы используются сами по себе, ухудшается стабильность и однородность липосом, и тем самым изменяются их физические и химические свойства. В результате, к сожалению, ухудшается функция липосом в качестве системы доставки лекарств и их иммунная активность, а также возникает токсичность. Поэтому проводятся исследования таких композиций, которые выгодны для производства, хранения и доставки, при этом максимально повышая преимущества липосом за счет добавления криопротекторов и т.п. с тем, чтобы предотвратить их деформацию в процессе сублимационной сушки.

Липополисахарид (LPS) является главным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий и способствует активации различных иммунных клеток, в особенности системы врожденного иммунитета. LPS активизирует антигенпрезентирующие клетки посредством секреции цитокинов клетками иммунной системы, экспрессии костимулирующих молекул на антигенпрезентирующих клетках и индукции презентации антигена, а также связывает врожденный иммунитет с адаптивным иммунитетом (Akira S, Uematsu S, Takeuchi O., *Cell* 124: 783-801 (2006); Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S et al., *Nat. Immunol.* 2: 947-950 (2001)).

LPS состоит из трех доменов, а именно амфифильного домена (липида А), центрального олигосахарида (OS) и О-антигена (или О-антигенного полисахарида). Известно, что липид А играет роль в эндотоксиновой активности LPS и проявляет иммуностимулирующие эффекты посредством передачи сигналов через TLR4 (Toll-like рецептор-4) у различных типов иммунных клеток (Raetz CR, Whitfield C, *Annu Rev Biochem.* 71: 635-700 (2002)). Производные липида А, которые проявляют пониженную токсичность, были мишенью для разработки иммуноадьювантов для человеческих вакцин. Монофосфорилипид А (MPL)-нетоксичное производное LPS, выделенное из неочищенного штамма *Salmonella minnesota*. Кроме того, комбинации солей алюминия с MPL были одобрены в качестве иммуноадьювантов для вакцин против HBV (вируса гепатита В) и HPV (вируса папилломы человека).

Еще с 1950-х годов было известно, что LPS обладает противораковым действием, но он не подходит для применения из-за токсичности, способной вызвать смерть от сепсиса даже при загрязнении на уровне нанограмм (нг). Поэтому постоянно проводились исследования, направленные на снижение токсичности LPS, и токсичность LPS удалось уменьшить, в частности, путем удаления полисахаридных цепей или деацилирования липида А (Katz SS et al., *J Biol Chem.* Dec 17, 274 (51): 36579-84, 1999). В частности, был разработан MPL, полученный путем фосфорилирования липида А, полученного путем удаления полисахаридной цепи LPS, в качестве иммунного противоракового средства, лишённого токсичности LPS, но известно, что его эффекты недостаточны.

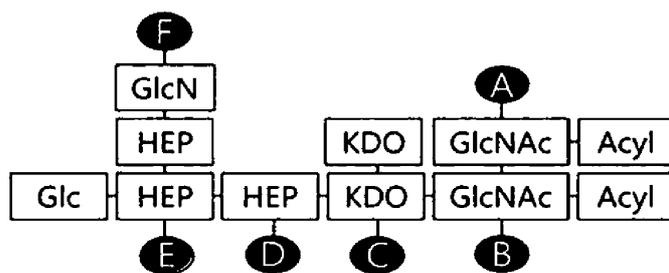
В результате усилий по разработке аналогов LPS, способных проявлять отличную иммуностимулирующую активность при одновременном снижении токсичности, которая вызывала проблемы при использовании обычного LPS, и преодоления физической и химической нестабильности липосом, авторы настоящего изобретения обнаружили EG-иммуномодулятор (EG-IM) с новой структурой и пониженной токсичностью, путем выделения и очистки LOS, не содержащего О-антигенного сайта, из штамма *E. coli*, встречающегося в кишечнике человека, и его деацилирования, и установили, что вакцинная композиция, содержащая этот иммуномодулятор и катионную липосому, проявляет отличную иммуностимулирующую активность. Исходя из этого, было совершено настоящее изобретение.

Сущность изобретения

Техническая проблема

Итак, одной из целей настоящего изобретения является получение композиции для усиления иммунитета, содержащей

(а) иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1:



[Формула 1]

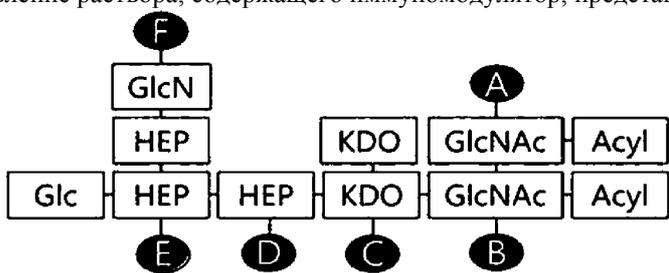
где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат, и

(b) катионную липосому.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение вакцинной композиции, содержащей (a) антиген и (b) указанную композицию для усиления иммунитета в качестве активного ингредиента.

Еще одной целью настоящего изобретения является способ получения указанной композиции для усиления иммунитета, включающий

(a) приготовление раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный формулой 1

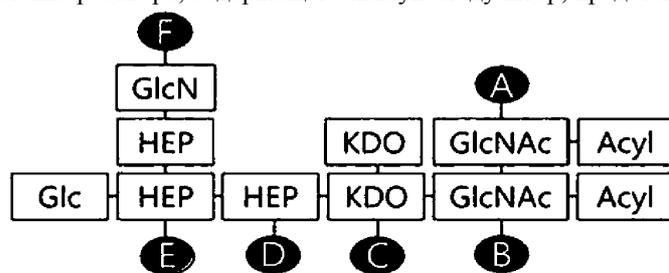


[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат; и (b) растворение липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов; (c) лиофилизацию смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя; и (d) регидратацию вещества, полученного на стадии (c), а затем смешивание этого вещества с раствором из стадии (a), получая при этом композицию для усиления иммунитета.

Еще одной целью настоящего изобретения является способ получения указанной вакцинной композиции, включающий

(a) приготовление раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный формулой 1

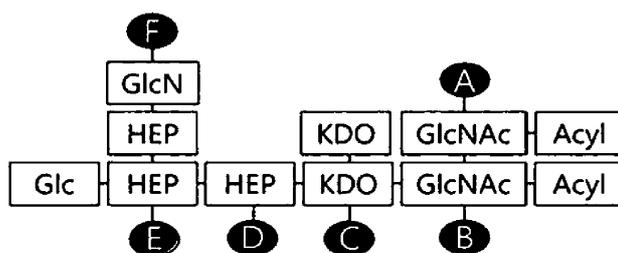


[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат; и (b) растворение липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов; (c) лиофилизацию смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя; (d) регидратацию вещества, полученного на стадии (c), получая при этом липосомы; и (e) добавление раствора из стадии (a) и антигена к липосомам из стадии (d) с последующей повторной лиофилизацией.

Техническое решение

Для достижения вышеуказанных целей настоящим изобретением предусмотрены композиция для усиления иммунитета, содержащая (a) иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1; и (b) катионную липосому

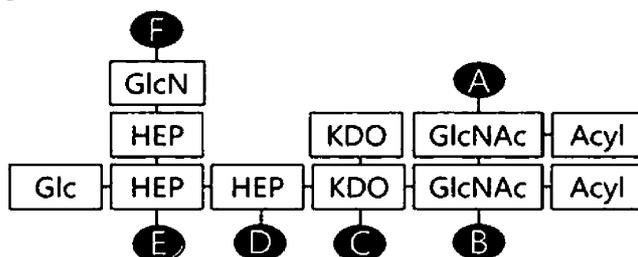


[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

Настоящим изобретением также предусмотрена вакцинная композиция, содержащая (а) антиген; и (b) указанную композицию для усиления иммунитета в качестве активного ингредиента.

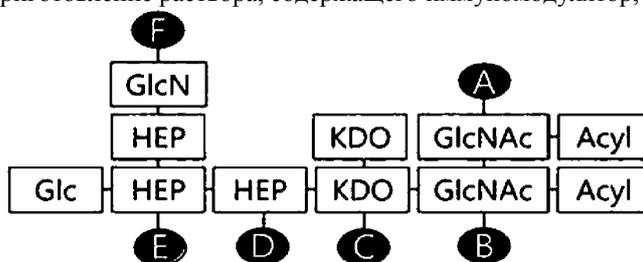
Настоящим изобретением также предусмотрен способ получения указанной композиции для усиления иммунитета, включающий (а) приготовление раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный формулой 1



[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат; и (b) растворение липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов; (c) лиофилизацию смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя; и (d) регидратацию вещества, полученного на стадии (c), а затем смешивание этого вещества с раствором из стадии (a), получая при этом композицию для усиления иммунитета.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ получения указанной вакцинной композиции, включающий (а) приготовление раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный формулой 1



[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат; и (b) растворение липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов; (c) лиофилизацию смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя; (d) регидратацию вещества, полученного на стадии (c), получая при этом липосомы; и (e) добавление раствора из стадии (a) и антигена к липосомам из стадии (d) с последующей повторной лиофилизацией.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A представлены результаты по идентификации экстрагированного LOS методом электрофореза и окрашивания серебром, а на фиг. 1B представлен результат, показывающий, что размер EG-IM на основе LOS, экстрагированного после удаления O-ацильной цепи липида А, уменьшается при обработке LOS щелочью, где М означает маркер, дорожка 1-LOS, экстрагированный перед деацилированием, а дорожка 2-иммуномодулятор (EG-IM).

На фиг. 2 представлена структура EG-иммуномодулятора (EG-IM) по настоящему изобретению, где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

На фиг. 3 представлены диаграммы распределения размеров липосом в способе с растворением липидов, а на фиг. 4 представлены диаграммы распределения размеров липосом в способе с простым смешиванием гликолипида с липосомами.

На фиг. 5 представлен график действия липосомального EG-IM на пролиферацию иммунных клеток.

На фиг. 6 представлен график действия липосомального EG-IM на секрецию TNF- α .

На фиг. 7 представлен график уменьшения цитотоксичности под действием липосомального EG-IM.

На фиг. 8 представлен результат, свидетельствующий о том, что образование вакцины, содержащей липосомальный EG-IM, происходит путем адсорбции за счет электростатического притяжения, где LP означает липосомы, S-супернатант, а P-осадок.

На фиг. 9 представлен график рекрутинга иммунных клеток под действием липосомального EG-IM.

На фиг. 10 представлены результаты анализа эффекта поглощения вакцины, содержащей липосомальный EG-IM, методом проточной цитометрии, а на фиг. 11 - эффект поглощения моноцитами, причем на фиг. 11A представлены результаты анализа флуоресцентно меченых специфичных к белку gE клеток в dLN, на фиг. 11B - результаты анализа флуоресцентно меченых специфичных к белку gE клеток в мышечной ткани, на фиг. 11C - результаты измерения флуоресцентно меченых специфичных к белку gE моноцитов в dLN, а на фиг. 11D - результаты измерения флуоресцентно меченых специфичных к белку gE моноцитов в мышечной ткани.

На фиг. 12 представлен эффект депо у вакцины, содержащей липосомальный EG-IM.

На фиг. 13 представлены титры антител, специфичных к антигену вируса Зика, у вакцины против вируса Зика, содержащей липосомальный EG-IM.

На фиг. 14A представлены титры JEV-специфичных антител у вакцины против японского энцефалита (JEV), содержащей липосомальный EG-IM, а на фиг. 14B - уровень секреции цитокина IFN- γ после введения вакцины против японского энцефалита.

На фиг. 15A представлены титры TB-специфичных антител у вакцины против туберкулеза (TB), содержащей липосомальный EG-IM, на фиг. 15B - уровень секреции цитокина IFN- γ после введения вакцины против туберкулеза, а на фиг. 15C - результаты анализа бактерицидного действия у вакцины против туберкулеза, содержащей липосомальный EG-IM.

На фиг. 16A представлены титры aP-специфичных антител у вакцины против коклюша, содержащей липосомальный EG-IM, а на фиг. 16B - результаты анализа пролиферации T-клеток CD4⁺ под действием вакцины против коклюша.

На фиг. 17A представлен уровень секреции цитокина IFN- γ после введения вакцины против коклюша, причем светлые столбики представляют результаты по клеткам селезенки, а темные столбики - результаты по клеткам легких. На фиг. 17B и 17C представлена способность индуцировать IFN- γ и IL-17, соответственно, при введении вакцины против коклюша.

На фиг. 18 представлен уровень секреции цитокина IFN- γ после введения вакцины против вируса ветряной оспы, содержащей липосомальный EG-IM.

На фиг. 19-21 представлены результаты анализа синергических эффектов при добавлении липидных ингредиентов к вакцине против вируса ветряной оспы, содержащей липосомальный EG-IM, причем на фиг. 19 представлены результаты при добавлении холестерина, на фиг. 20 - результаты при добавлении сквалена, а на фиг. 21 - результаты при добавлении трикаприна.

На фиг. 22 представлен синергический эффект при добавлении ингредиента иммуноадыванта на основе сапонина к вакцине против вируса ветряной оспы, содержащей липосомальный EG-IM.

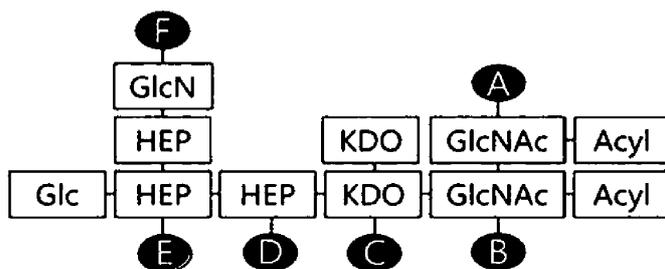
На фиг. 23 представлен анализ иммуногенности в зависимости от конечной формулы вакцины против вируса ветряной оспы, содержащей липосомальный EG-IM. На фиг. 23A представлен уровень секреции цитокина IL-5, а на фиг. 23B и 23C - уровень секреции цитокина IFN- γ , причем NP-A означает DDA/DOPC, NP-B-DOTAP/DMPC, NP-C-DOTAP/DMPC/сквален, NP-D-DOTAP/DMPC/трикаприн, + означает простую смешанную форму, а / означает смешанную и лиофилизованную форму.

Раскрытие сущности изобретения

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такие же значения, которые известны специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение. В общем, используемая здесь номенклатура и описанные ниже способы проведения экспериментов хорошо известны в данной области, обычно они и применяются.

В одном воплощении настоящего изобретения липосомальный EG-IM получают путем смешивания смешанного раствора липидов, содержащего смесь DMPC и DOTAP, с раствором EG-иммуномодулятора (EG-IM), получая смешанный раствор липидов, содержащий EG-IM, с последующей регидратацией, а влияние липосомального EG-IM на пролиферацию иммунных клеток и снижение цитотоксичности исследовали на клеточной линии макрофагов мыши.

Соответственно в одном аспекте настоящее изобретение направлено на композиции для усиления иммунитета, содержащие (а) иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1; и (b) катионную липосому

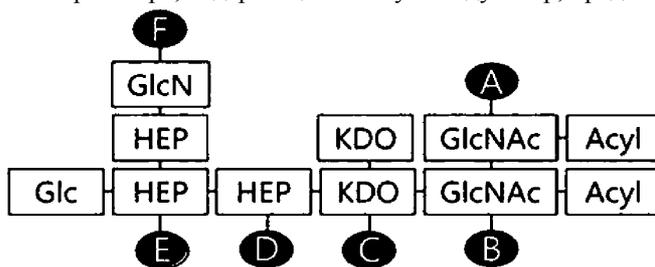


[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения композиций для усиления иммунитета, причем композиции для усиления иммунитета могут быть получены посредством следующих стадий:

(а) приготовления раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный формулой 1



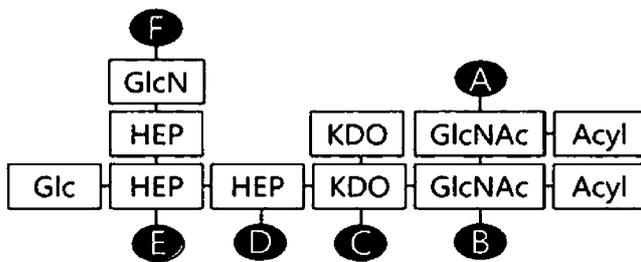
[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат;

(b) растворения липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов;
(c) лиофилизации смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя; и

(d) регидратации вещества, полученного на стадии (c), а затем смешивания этого вещества с раствором из стадии (a), получая при этом композицию для усиления иммунитета.

EG-иммуномодулятор (EG-IM) по настоящему изобретению может быть представлен следующей формулой 1:



[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат.

В настоящем изобретении термин "LOS (липоолигосахарид)" относится к вариантам LPS (липополисахарида) с более короткой сахаридной цепочкой, чем у природного LPS, поэтому они имеют меньшую молекулярную массу. Перед деацилированием LOS предпочтительно имеет молекулярную массу от 3000 до 10000 Да, более предпочтительно от 3000 до 4000 Да. Термин "деацилированный LOS" означает такой LOS, у которого удалена жирная кислота, соединенная с глюкозамином липида А через связь -C(O)O-, и сильно снижена токсичность по сравнению с LOS. Жирная кислота соединяется с глюкозамином липида А через связи -C(O)O- и -C(O)NH-. Деацилированный LOS настоящего изобретения представляет собой LOS, у которого жирная кислота, соединенная связью -C(O)O-, удалена посредством деацилирования липида А.

EG-IM может быть получен различными способами, но может быть получен в соответствии со способами, раскрытыми в предшествующих патентах авторов настоящего изобретения, а именно Korean Patent No. 0456681; WO 2004/039413; Korean Patent No. 0740237; и WO 2006/121232. К примеру, LPS деацилируют путем обработки сильным основанием (напр., 0,2N NaOH), чтобы удалить некоторые жирные кислоты из липида А и тем самым его детоксицировать.

Согласно настоящему изобретению, EG-IM может быть связан с 2-6 фосфатными группами, предпочтительно с 3-4 фосфатными группами, без ограничения. Кроме того, количество и положения фосфатных групп в формуле 1 могут быть такими, как приведенные ниже в табл. 1.

Таблица 1

Пример	Количество фосфатных групп	Положения фосфатных групп	Пример	Количество фосфатных групп	Положения фосфатных групп
Пример 1	2	A, B	Пример 25	3	A, E, F
Пример 2	2	A, C	Пример 26	3	B, C, D
Пример 3	2	A, D	Пример 27	3	B, C, E
Пример 4	2	A, E	Пример 28	3	B, C, F
Пример 5	2	A, F	Пример 29	3	B, D, E
Пример 6	2	B, C	Пример 30	4	B, D, F
Пример 7	2	B, D	Пример 31	3	B, E, F
Пример 8	2	B, E	Пример 32	3	C, D, E
Пример 9	2	B, F	Пример 33	3	C, D, F
Пример 10	2	C, D	Пример 34	3	C, E, F
Пример 11	2	C, E	Пример 35	3	D, E, F
Пример 12	2	C, F	Пример 36	4	A, B, C, D
Пример 13	2	D, E	Пример 37	4	A, B, C, E
Пример 14	2	D, F	Пример 38	4	A, B, C, F
Пример 15	2	E, F	Пример 39	4	A, B, D, E
Пример 16	3	A, B, C	Пример 40	4	A, B, D, F
Пример 17	3	A, B, D	Пример 41	4	A, B, E, F
Пример 18	3	A, B, E	Пример 42	4	A, C, D, E
Пример 19	3	A, B, F	Пример 43	4	A, C, D, F
Пример 20	3	A, C, D	Пример 44	4	A, D, E, F
Пример 21	3	A, C, E	Пример 45	5	A, B, C, D, E
Пример 22	3	A, C, F	Пример 46	5	A, B, C, D, F
Пример 23	3	A, D, E	Пример 47	6	A, B, C, D, E, F
Пример 24	3	A, D, F			

Фосфат связывается в положениях, выбранных из группы, состоящей из AB, AC, AD, AE, AF, BC, BD, BE, BF, CD, CE, CF, DE, DF, EF, ABC, ABD, ABE, ABF, ACD, ACE, ACF, ADE, ADF, AEF, BCD, BCE, BCF, BDE, BDF, BEF, CDE, CDF, CEF, DEF, ABCD, ABCE, ABCF, ABDE, ABDF, ABEF, ACDE, ACDF, ADEF, BCDE, BCDF, BCEF, BDEF, CDEF, ABCDE, ABCEF и ABCDEF в формуле 1.

Согласно настоящему изобретению, сахараиды в формуле 1 выбирают из группы, состоящей из гексозы, гексозамина, N-ацетилгексозамина, гептозы и Kdo (2-кето-3-дезоксиктоната).

В настоящем изобретении термин "гексоза" означает моносахарид, содержащий 6 атомов углерода в молекуле, а их примеры включают, без ограничения, кетогексозы (психоза, фруктоза, сорбоза, тагатаза), альдогексозы (аллоза, альтроза, глюкоза, манноза, гулоза, идоза, галактоза, талоза) и дезоксигексозы (фукоза, фукулоза, рамноза).

Согласно настоящему изобретению, гексоза представлена альдогексозой, а в определенных примерах альдогексоза представлена глюкозой или галактозой.

В настоящем изобретении термин "гептоза" означает моносахарид, содержащий 7 атомов углерода в молекуле, которые подразделяются на альдогептозы (положение 1) и кетогептозы (положение 2) в соответствии с положением функциональных групп (альдегидных и кетогрупп). Примером альдогептозы является L-глицеро-D-манногептоза, без ограничения. Примером кетогептозы является седогептулоза и манногептулоза, без ограничения.

Согласно настоящему изобретению, гексозамин представляет собой глюкозамин, галактозамин или маннозамин, а в определенных примерах гексозамин представляет собой глюкозамин.

Согласно настоящему изобретению, N-ацетилгексозамин представляет собой N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или N-ацетилманнозамин, а в определенных примерах N-ацетилгексозамин представляет собой N-ацетилглюкозамин.

EG-IM по настоящему изобретению содержит меньше сахаридов, чем LPS дикого типа. Согласно настоящему изобретению, EG-IM может содержать от 5 до 7 сахаридов. В определенных примерах EG-IM содержит 6 или 7 сахаров, без ограничения.

EG-IM по настоящему изобретению не содержит O-связанных жирных кислот.

EG-IM по настоящему изобретению отличается тем, что он обладает значительно меньшей токсичностью, так как из липида A удалена (деацилирована) жирная кислота (к примеру, жирная кислота C14). Жирная кислота соединяется с глюкозамином в липиде A через связь -C(O)O- или -C(O)NH-. В настоящем изобретении деацилирование означает удаление жирной кислоты, соединенной через связь -C(O)O-.

Деацилирование может осуществляться путем обработки LOS щелочью, а щелочи включают NaOH, KOH, Ba(OH)₂, CsOH, Sr(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH, RbOH и Mg(OH)₂, более предпочтительно NaOH, KOH, Ba(OH)₂, Ca(OH)₂, LiOH и Mg(OH)₂, еще более предпочтительно NaOH, KOH и Mg(OH)₂, наиболее предпочтительно NaOH.

Согласно настоящему изобретению, EG-IM по настоящему изобретению происходит из E. coli, а E. coli представляет собой Escherichia coli EG0024 (номер доступа KCTC 12948BP). Этот штамм был депо-

нирован 19 ноября 2015 г. с депозитным номером КСТС 12948BP в Корейской коллекции типовых культур Корейского научно-исследовательского института биологии и биотехнологии.

EG-IM по настоящему изобретению особенно подходит для вакцинных композиций настоящего изобретения, так как он проявляет отличные иммуностимулирующие эффекты и меньшую токсичность по сравнению с обычными иммуноадьювантами. EG-IM по настоящему изобретению менее токсичен, чем MPL (монофосфориллипид А), полученный путем фосфорилирования липида А, полученного путем удаления полисахаридной цепочки из LPS для устранения токсичности LPS.

Катионная липосома по настоящему изобретению представляет собой катионный липид, выбираемый из группы, состоящей из диметилдиокадециламмонийбромида (DDA), 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), 3β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерина (DC-Chol), 1,2-диолеоилокси-3-диметиламмонийпропана (DODAP), 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропана (DOTMA), 1,2-димиристолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 14:1), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 16:0-18:1), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 18:1), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 18:0), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 16:0), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 14:0), 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 12:0), N1-[2-((1S)-1-[(3-аминопропил)амино]-4-[ди(3-аминопропил)амино]бутилкарбоксамидо)этил]-3,4-ди[олеилокси]бензамида (MVL5), 1,2-димиристоил-3-диметиламмоний-пропана (DAP 14:0), 1,2-дипальмитоил-3-диметиламмоний-пропана (DAP 16:0), 1,2-дистеароил-3-диметиламмоний-пропана (DAP 18:0), N-(4)-карбоксивензил)-N,N-диметил-2,3-бис(олеилокси)пропан-1-аминия (DOBAQ), 1,2-стеароил-3-триметиламмоний-пропана (TAP 18:0), 1,2-дипальмитоил-3-триметиламмоний-пропана (TAP 16:0), 1,2-димиристоил-3-триметиламмоний-пропана (TAP 14:0) и N4-холестерил-спермина (GL67). Катионная липосома может применяться сама по себе или в комбинации с нейтральным липидом, выбранным из группы, состоящей из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (DMPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфозаноламина (DOPE), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), 1,2-дилинолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DLPC), фосфозаноламина (PE) и фосфатидилхолина (PC). В одном воплощении настоящего изобретения в основном используется комбинация DOTAP и DMPC (DOTAP:DMPC), комбинация DDA и DOPC (DDA:DOPC) и комбинация DDA и DMPC (DDA:DMPC).

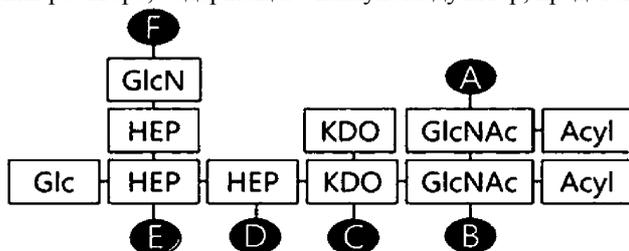
В настоящем изобретении термин "иммуностимуляция" относится к индукции первоначального иммунного ответа или усилению обычного иммунного ответа на антиген в измеримой степени.

В другом воплощении настоящего изобретения липосомальный EG-IM получают путем смешивания раствора смешанных липидов, содержащего смесь DMPC и DOTAP, с раствором EG-иммуномодулятора (EG-IM), получая смешанный раствор липидов, содержащий EG-IM, с последующей регидратацией, а затем готовят вакцину, добавляя антиген к липосомному EG-IM, а для установления эффективности вакцин вакцины, полученные при смешивании липосомального EG-IM с рекомбинантным белком оболочки вируса Зика, антигеном вируса японского энцефалита (JEV), рекомбинантными антигенами туберкулеза, а именно Ag85A, ESAT-6 и HspX, бесклеточным антигеном вакцины против коклюша (aP) и рекомбинантным антигеном gE вируса ветряной оспы (VZV), вводятся мышам, измеряются титры антител к ним и проводится анализ цитокинов. В результате оказалось, что каждая из вакцин эффективно вызывает отличный опосредованный антителами иммунитет и/или клеточный иммунитет.

Соответственно в другом аспекте настоящее изобретение направлено на вакцинные композиции, содержащие антиген и композицию для усиления иммунитета в качестве активного ингредиента.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения вакцинных композиций, причем вакцинные композиции могут быть получены посредством следующих стадий:

(а) приготовления раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1



[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктоонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат;

(b) растворения липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов;
(c) лиофилизации смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя; и

(d) регидратации вещества, полученного на стадии (c), получая при этом липосомы; и

(e) добавления раствора из стадии (a) и антигена к липосомам из стадии (d) с последующей повтор-

ной лиофилизацией.

В настоящем изобретении термин "антиген" относится к веществам, которые индуцируют иммунный ответ у получателя. Так, в настоящем изобретении можно использовать любые вещества, проявляющие такую активность индукции иммунного ответа, без ограничений.

Антиген по настоящему изобретению может представлять собой пептид, белок, нуклеиновую кислоту, сахарид, патоген, аттенуированный патоген, инактивированный патоген, вирус, вирусоподобные частицы (VLP), клетки или фрагменты клеток.

В настоящем изобретении антигеном может быть антиген вируса Зика, антиген вируса японского энцефалита, антиген *Mycobacterium tuberculosis*, антиген коклюша, антиген вируса ветряной оспы, антиген *Haemophilus influenzae* типа В (НТВ), антиген вируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS), антиген *Pseudomonas aeruginosa*, антиген сибирской язвы, антиген вируса гепатита А (HAV), антиген вируса гепатита В (HBV), антиген вируса гепатита С (HCV), антиген вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), антиген вируса *Herpes simplex* (HSV), антиген *Neisseria meningitidis*, антиген *Corynebacterium diphtheriae*, антиген *Bordetella pertussis*, антиген *Clostridium tetani*, антиген вируса папилломы человека (HPV), антиген энтерококков, антиген *Staphylococcus aureus*, антиген *Klebsiella pneumoniae*, антиген *Acinetobacter baumannii*, антиген *Enterobacter*, антиген *Helicobacter pylori*, антиген малярии, антиген вируса денге, антиген *Orientia tsutsugamushi*, антиген буньявируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), антиген коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), антиген вируса гриппа, антиген вируса Эбола и антиген *Diplococcus pneumoniae*. В одном воплощении настоящего изобретения эффект усиления иммуногенности по настоящему изобретению идентифицируют при помощи антигена вируса Зика, антигена вируса японского энцефалита, антигена *Mycobacterium tuberculosis*, антигена коклюша и антигена вируса ветряной оспы.

Антиген вируса ветряной оспы по настоящему изобретению может включать по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из антигенов gB (gpII), gC (gpV), gE (gpI), gH (gpIII), gI (gpIV), gK и gL (gpVI).

Вакцины по настоящему изобретению могут применяться для профилактики или лечения заболеваний, причем вакцина может быть в виде инактивированной вакцины, аттенуированной вакцины, субъединичной вакцины, конъюгатной вакцины, рекомбинантной вакцины, моновалентной вакцины, поливалентной вакцины или смешанной вакцины.

Кроме того, вакцина по настоящему изобретению может представлять собой вакцину против вируса Зика, вакцину против японского энцефалита, вакцину против туберкулеза, вакцину против коклюша, вакцину против вируса ветряной оспы (VZV), вакцину против *Haemophilus influenzae* типа В, вакцину против MERS, вакцину против *Pseudomonas aeruginosa*, вакцину против рака, вакцину против сибирской язвы, вакцину против HAV, вакцину против HBV, вакцину против HCV, вакцину против ВИЧ, менингококковую вакцину, вакцину против дифтерии, вакцину против столбняка, вакцину против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, вакцину против энтерококков, вакцину против *Staphylococcus aureus*, вакцину против *Klebsiella pneumoniae*, вакцину против *Acinetobacter baumannii*, вакцину против *Enterobacter*, вакцину против *Helicobacter pylori*, вакцину против малярии, вакцину против вируса денге, вакцину против *Orientia tsutsugamushi*, вакцину против буньявируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), вакцину против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), вакцину против вируса Эбола, вакцину против вируса гриппа или вакцину против *Diplococcus pneumoniae*.

Противораковая вакцина может быть выбрана из группы, состоящей из вакцин против фибросаркомы, рака мочевого пузыря, аденомы гипофиза, глиомы, опухолей головного мозга, рака носоглотки, рака гортани, тимомы, мезотелиомы, рака молочной железы, рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака толстой кишки рака печени, рака поджелудочной железы, эндокринной опухоли поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака полового члена, рака мочеточников, почечно-клеточного рака, рака простаты, неходжкинской лимфомы, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, плазмоцитарных опухолей, лейкоза, рака у детей, рака кожи, рака яичников и рака шейки матки, без ограничения.

Вакцина по настоящему изобретению может представлять собой рецептуру типа простой смеси или лиофилизованную форму.

Вакцина по настоящему изобретению может содержать описанный выше антиген, иммуномодулятор, представленный формулой 1, и катионную липосому в одном контейнере (вакцина типа "все в одном"). Исходя из этой особенности, вакцина может быть приготовлена в готовом к применению виде. Предпочтительно вакцина против вируса ветряной оспы, то есть вакцина против *Herpes zoster* или ветряной оспы, может быть получена в готовом к применению виде.

Кроме того, вакцина по настоящему изобретению может дополнительно содержать липидный ингредиент, принятый в данной области, а в одном воплощении настоящего изобретения получали вакцины, дополнительно содержащие холестерин, сквален или трикаприн, причем был установлен эффект усиления ими иммуногенности (фиг. 19-21).

Кроме того, вакцина по настоящему изобретению может дополнительно содержать сапонин, Quil A, QS21 и др. в качестве иммуноадьюванта, приемлемого в данной области. В одном воплощении настоя-

шего изобретения получали вакцины, содержащие Quil A, вещество - производное сапонины, причем был установлен эффект усиления ими иммуногенности (фиг. 22).

Вакцинные композиции настоящего изобретения могут содержать фармацевтически приемлемый носитель, а также ингредиенты, которые обычно применяются в качестве рецептурного вещества, типа лактозы, декстрозы, сахарозы, сорбита, маннита, крахмала, гуммиарабика, фосфата кальция, альгината, желатина, силиката кальция, микрокристаллической целлюлозы, поливинилпирролидона, целлюлозы, воды, сиропа, метилцеллюлозы, метилгидроксibenзоата, пропилгидроксibenзоата, талька, стеарата магния и минерального масла, без ограничения. Вакцинные композиции настоящего изобретения также могут содержать смазывающие, смачивающие вещества, подсластители, ароматизаторы, эмульгаторы, суспендирующие вещества, консерванты и т.п., в дополнение к ингредиентам, описанным выше. Подходящие фармацевтически приемлемые носители и рецептуры подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995).

Вакцинные композиции настоящего изобретения можно вводить перорально или парентерально. В случае парентерального введения вакцинные композиции можно вводить внутривенно, подкожно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, трансдермально и т.п.

Подходящие дозировки вакцинных композиций настоящего изобретения можно назначать по-разному на основе таких факторов, как способ составления, способ введения и возраст, вес тела, пол, патология, рацион, время введения, способ введения, скорость выведения и восприимчивость пациента.

Вакцинные композиции настоящего изобретения могут быть получены в виде однократной дозовой формы или же заключены во флаконы с множественными дозами при составлении лекарственной формы с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или эксципиента в соответствии со способом, который может легко выполняться рядовыми специалистами в той области техники, к которой относится настоящее изобретение. В данное время лекарственные формы могут быть в виде растворов, суспензий или эмульсий в масляной или водной среде или же в виде экстракта, порошка, гранул, таблеток или капсул и могут дополнительно содержать диспергатор или стабилизатор.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно на следующих примерах. Однако специалистам в данной области должно быть ясно, что эти примеры приводятся только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Препаративный пример 1. Получение иммуномодулятора (EG-IM).

1. Получение высушенных клеток штамма.

Культивировали *E. coli* со встряхиванием при 80 об/мин или меньше в 30 г/л среды TSB (триптический соевый бульон, Difco) при 37°C в течение 20 ч и собирали клетки с помощью центрифуги. Собранные клетки смешивали с этанолом и центрифугировали, получая осадок. Затем к полученному осадку добавляли ацетон, тщательно перемешивали, а затем центрифугировали, получая осадок. К полученному осадку добавляли этиловый эфир, тщательно перемешивали, а затем центрифугировали, получая осадок. Полученный осадок высушивали в сушильном шкафу при 60°C, получая высушенные бактериальные клетки.

2. Экстрагирование LOS.

После измерения веса высушенных бактериальных клеток добавляли 7,5 мл экстрагирующего раствора PCP (фенол, хлороформ, петролейный эфир) на 1 г массы для выделения LOS из бактериальных клеток. Из полученного при этом экстракта LOS удаляли органический растворитель при высокой температуре на роторном испарителе. Полученный экстракт центрифугировали при высокой температуре, получая осадок, который промывали этиловым эфиром. Затем туда же добавляли очищенную воду для образования осадка. Образовавшийся осадок центрифугировали и отделяли от супернатанта, а полученный при этом осадок промывали этанолом и собирали. Осадок тщательно высушивали в сушильной печи при высокой температуре, а затем растворяли в очищенной воде для экстракции LOS.

3. Устранение токсичности LOS.

После определения содержания экстракта LOS довели концентрацию экстракта LOS до 3 мг/мл и смешивали экстракт LOS с 0,2 н. NaOH при объемном соотношении 1:1. Проводили реакцию в водяной бане с постоянной температурой при 60°C в течение 120 мин с перемешиванием на вибромешалке в течение 5 с каждые 10 мин. Затем туда же добавляли 1N уксусную кислоту в количестве примерно 1/5 от исходного количества 0,2 н NaOH. Затем получали иммуномодулятор EG-IM путем осаждения этанолом.

4. Определение и идентификация LOS и EG-IM.

Содержание LOS и EG-IM измеряли по анализу KDO (2-кето-3-диоксиоктонат) с помощью 2-тиобарбитуровой кислоты, измеряли их концентрации и разделяли LOS и EG-IM по размеру методом SDS-PAGE и идентифицировали по окрашиванию серебром, что представлено на фиг. 1. На фиг. 1А представлены результаты по идентификации экстрагированного LOS методом электрофореза и окрашивания серебром. На фиг. 1В представлен результат, показывающий, что размер EG-IM на основе LOS, экстрагированного при деградации липида А, уменьшается при обработке LOS щелочью, где М означает маркер (предварительно окрашенный стандарт SeeBlue® Plus 2, Invitrogen, LC5952), дорожка 1 - LOS,

экстрагированный перед деацелированием, а дорожка 2 -деацелированный LOS (EG-IM).

Пример 1. Структурный анализ иммуномодулятора (EG-IM).

Очищенный образец соответствующим образом разбавляли очищенной водой. На прибор (UPLC, Waters) устанавливали обратнофазовую колонку CU18 (Acquity BEH300 C18 1,7 мкм, 2,1×150 мм), а затем разделяли образец в градиенте концентрации от 35 до 95% подвижной фазы А (50 мМ формиат аммония, рН 4,5) и подвижной фазы В (100% ацетонитрила). Проводили анализ методом MS и MS/MS на масс-спектрометре (Velos Pro, Thermo). Анализировали молекулы с молекулярной массой от 100 до 3000 масса/заряд. После MS-анализа идентифицированные молекулы с молекулярной массой от 50 до 2000 масса/заряд подвергали анализу еще раз. В качестве основного ингредиента была идентифицирована молекула с молекулярной массой 2372 масса/заряд, а на фиг. 2 схематически представлена структура, полученная при анализе каждого пика.

Препаративный пример 2. Получение содержащих EG-IM липосом (липосомального EG-IM).

1. Приготовление раствора EG-IM и раствора MPL.

(1) Приготовление 0,3% (об./об.) раствора триэтиламина, содержащего EG-IM Готовили 0,3% (об./об.) раствор триэтиламина, содержащий 1 мг/мл EG-IM, и хранили при -20°C.

(2) Приготовление 10% (вес./об.) раствора сахарозы, содержащего EG-IM Готовили 10% (вес./об.) раствор сахарозы, содержащий 1 мг/мл EG-IM.

(3) Приготовление 0,3% (об./об.) раствора триэтиламина, содержащего MPL.

Во флакон, содержащий 5 мг MPL, добавляли 5 мл 0,3% (об./об.) триэтиламина, энергично перемешивали на вибротомешалке и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, получая однородный раствор MPL. Полученный раствор в 1 мг/мл вносили порциями в силиконовые пробирки и хранили при -20°C.

2. Получение липосомального EG-IM.

(1) Растворение липидов и приготовление образцов путем смешивания с гликолипидом.

Готовили раствор 1 мг/мл DMPC или DOTAP, используя в качестве растворителя трет-бутиловый спирт, а затем перемешивали на вибротомешалке. Разливали во флаконы по 1 мл приготовленного раствора DMPC и 1 мл раствора DOTAP, получая смешанный раствор липидов, в котором DMPC и DOTAP смешаны в соотношении 1:1 (об./об.).

Смешанный раствор липидов смешивали с 0,3% (об./об.) триэтиламином, содержащим EG-IM, получая смешанные растворы липидов, содержащие 6 мол.%, 3 мол.% или 1 мол.% EG-IM, а также смешанный раствор липидов смешивали с 0,3% (об./об.) триэтиламином, содержащим MPL, получая смешанные растворы липидов, содержащие 6 мол.%, 3 мол.% или 1 мол.% MPL. Затем флаконы, содержащие смешанные растворы липидов, сначала замораживали в морозильнике при -70°C на 1 ч, а затем лиофилизировали в течение 12 ч или больше, получая "лепешки" из смеси липидов.

(2) Получение липосом через процесс регидратации.

Во флаконы с простой смесью липидов и флаконы со смесью липидов, содержащей EG-IM или MPL, в присутствии "лепешки" из смеси липидов добавляли 1 мл 10% (вес./об.) раствора сахарозы, а затем перемешивали на вибротомешалке, получая липосомы.

(3) Приготовление образцов путем простого смешивания гликолипидов с липосомами 10% (вес./об.) растворы сахарозы, содержащие EG-IM, смешивали с раствором липосом в соответствующей дозировке, получая образцы, содержащие простые смеси липосом с 6 мол.%, 3 мол.% или 1 мол.% EG-IM.

0,3% (об./об.) растворы триэтиламина, содержащие MPL, смешивали с раствором липосом, получая образцы, содержащие простые смеси липосом с 6 мол.%, 3 мол.% или 1 мол.% MPL.

Пример 2. Анализ физических свойств липосомального EG-IM.

1. Анализ размеров липосом.

(1) Анализ степени изменения размеров липосом.

В кюветы вносили по 1 мл образца с растворением липидов или 1 мл образца, полученного при простом смешивании гликолипида из Препаративного примера 2-(3) с липосомами, и измеряли гидродинамические размеры на установке для динамического рассеяния света (ZSP Nano, Malvern Instruments) (табл. 2).

Таблица 2

Тип гликолипида	Способ включения гликолипида	Размер липосом (d, нм)		
		Содержание гликолипида		
		6 мол.%	3 мол.%	1 мол.%
MPL	растворение липидов	355,4 ± 7,1	309,2 ± 3,7	367,9 ± 16,1
	простое смешивание с липосомами	1538,7 ± 457,1	1206,1 ± 244,2	694,9 ± 33,2
EG-IM	растворение липидов	439,3 ± 6,1	386,1 ± 1,2	372,7 ± 6,0
	простое смешивание с липосомами	829,8 ± 11,1	414,0 ± 43,7	565,7 ± 28,9

В результате было отмечено, что MPL вызывает увеличение размеров при простом смешивании с

липосомами. С другой стороны, EG-IM слегка повышал размеры, но они составляли менее 1 мкм при получении способом простого смешивания при высоком содержании, а содержание и способ получения не влияли на изменение размера. Таким образом, липосомальный EG-IM (содержащие EG-IM липосомы) может быть получен в различном виде типа инкапсуляционных или адсорбционных форм вследствие небольшой степени изменений размеров после получения, а также может быть получен в нанодиапазоне от 300 до 600 нм (<1 мкм).

(2) Анализ однородности размера липосом.

В кюветы вносили по 1 мл образца с растворением липидов или 1 мл образца, полученного при простом смешивании гликолипида из препаративного примера 2-(3) с липосомами, и анализировали гидродинамические размеры и их распределение на установке для динамического рассеяния света (ZSP Nano, Malvern Instruments) (Табл. 3, фиг. 3 и 4). На фиг. 3 представлены диаграммы распределения размеров липосом в способе с растворением липидов, а на фиг. 4 представлены диаграммы распределения размеров липосом в способе с простым смешиванием гликолипида с липосомами.

Таблица 3

Тип гликолипида	Способ включения гликолипида	PDI липосом		
		Содержание гликолипида		
		6 мол.%	3 мол.%	1 мол.%
MPL	растворение липидов	0,405 ± 0,080	0,412 ± 0,030	0,353 ± 0,011
	простое смешивание с липосомами	0,887 ± 0,098	0,793 ± 0,052	0,552 ± 0,020
EG-IM	растворение липидов	0,271 ± 0,209	0,405 ± 0,019	0,407 ± 0,020
	простое смешивание с липосомами	0,227 ± 0,031	0,402 ± 0,133	0,471 ± 0,016

В результате оказалось, что дисперсность MPL повышается в зависимости от концентрации. С другой стороны, дисперсность EG-IM оставалась одинаковой независимо от содержания.

При включении гликолипида способом растворения липидов образуются липосомы, в которых гликолипид инкапсулирован (фиг. 3). Оказалось, что в случае MPL распределение размеров полученных липосом было неоднородным и образовывались мицеллы самого MPL (фиг. 3А, 3С и 3Е). С другой стороны, в случае EG-IM оказалось, что препараты липосом получаются однородными, образуя единственный пик (фиг. 3В, 3Д и 3Ф). Таким образом, оказалось, что EG-IM может равномерно инкапсулироваться в липосомах.

При простом смешивании липосом с гликолипидом образуются липосомы, в которых гликолипид адсорбирован на поверхности липосом (фиг. 4). В случае MPL оказалось, что распределение размеров полученных липосом было неоднородным (табл. 3) и образовывались мицеллы самого MPL (фиг. 4А, 4С и 4Е). С другой стороны, в случае EG-IM оказалось, что препараты липосом получаются однородными, образуя единственный пик (фиг. 4В, 4Д и 4Ф). Таким образом, оказалось, что EG-IM также может равномерно адсорбироваться на липосомах.

2. Анализ поверхностного заряда липосом.

В кюветы для измерения поверхностного заряда (ζ -потенциала) вносили по 1 мл образца с растворением липидов или 1 мл образца, полученного при простом смешивании гликолипида из препаративного примера 2-(3) с липосомами, и измеряли поверхностный заряд на установке для динамического рассеяния света (ZSP Nano, Malvern Instruments) (табл. 4).

Таблица 4

Тип гликолипида	Способ включения гликолипида	Поверхностный заряд липосом (мВ)		
		Содержание гликолипида		
		6 мол.%	3 мол.%	1 мол.%
MPL	растворение липидов	23,7 ± 0,6	56,2 ± 0,6	57,0 ± 3,0
	простое смешивание с липосомами	48,5 ± 1,4	56,9 ± 3,4	57,8 ± 1,6
EG-IM	растворение липидов	54,7 ± 1,3	59,2 ± 1,0	55,2 ± 2,7
	простое смешивание с липосомами	57,5 ± 1,3	56,5 ± 2,3	55,1 ± 2,6

В результате в случае EG-IM поверхностный заряд оставался одинаковым на уровне 55 мВ, независимо от содержания. С другой стороны, в случае MPL поверхностный заряд резко снижался при смешивании при высоком содержании в 6 мол. %.

Пример 3. Анализ механизма липосомального EG-IM.

1. Влияние липосомального EG-IM на пролиферацию иммунных клеток и снижение цитотоксичности (1) Влияние липосомального EG-IM на пролиферацию иммунных клеток.

Клетки клеточной линии (J774А.1) макрофагов мыши обрабатывали EG-IM (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 или 1,0 мкг/мл) и различными концентрациями липосом (1,25, 2,5, 5, 25 или 50 мкг/мл катионных липидов)

либо их смесью. Через 24 ч после обработки клеток исследуемым реагентом клетки обрабатывали раствором ССК-8 и оставляли для реакции на 1 ч. По завершении реакции собирали культивированные клетки, измеряли поглощение при 450 нм и рассчитывали жизнеспособность клеток в каждой опытной группе, принимая за 100% поглощение в группе, обработанной культуральным раствором (группа отрицательного контроля).

Группа NP получала обработку только липосомами, группа NP + EG-IM получала обработку простой смесью EG-IM и жидких липосом, а группа NP/EG-IM получала обработку препаратом, полученным при лиофилизации смеси липосом и EG-IM.

NP-A означает липосомы с DDA:DOPC, NP-B - липосомы с DOTAP:DMPC, NP-C - липосомы с DOTAP:DMPC:скваленом, а NP-D - липосомы с DOTAP:DMPC:трикаприном.

В результате оказалось, что при смешивании EG-IM с различными концентрациями катионных липосом усиливался рост иммунных клеток (фиг. 5).

(2) Влияние липосомального EG-IM на секрецию TNF- α .

Клетки клеточной линии (J774A.1) макрофагов мыши обрабатывали EG-IM (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 или 1,0 мкг/мл) и различными концентрациями липосом (1,25, 2,5, 5, 25 или 50 мкг/мл катионных липидов) либо их смесью. Клетки обрабатывали исследуемым реагентом и культивировали в течение 24 ч, а затем измеряли уровень секреции цитокина TNF- α в культуральной среде клеток методом сэндвич-ELISA.

Группа NP получала обработку одними липосомами, группа NP + EG-IM получала обработку простой смесью EG-IM и жидких липосом, а группа NP/EG-IM получала обработку препаратом, полученным при лиофилизации смеси липосом и EG-IM.

NP-A означает липосомы с DDA:DOPC, NP-B - липосомы с DOTAP:DMPC, NP-C - липосомы с DOTAP:DMPC:скваленом, а NP-D - липосомы с DOTAP:DMPC:трикаприном.

В результате оказалось, что при смешивании EG-IM с различными концентрациями катионных липосом индуцировалась активная секреция TNF- α (фиг. 6).

(3) Влияние липосомального EG-IM на ослабление цитотоксичности.

Общеизвестно, что катионные липосомы вызывают цитотоксичность. Определяли, будет ли полученный липосомальный EG-IM ослаблять цитотоксичность катионных липосом посредством EG-IM. Цитотоксичность липосомального EG-IM измеряли на клетках MRC-5 фибробластов человека. Определяли цитотоксичность полученных липосом и катионных липосом, состоящих из DDA:DMPC, в зависимости от наличия или отсутствия холестерина и способа гомогенизации, а также от наличия или отсутствия иммуностимулирующего вещества, EG-IM. Клетки MRC-5 стимулировали путем обработки каждым веществом в различных концентрациях, а цитотоксичность оценивали методом анализа МТТ.

A означает липосомы, не содержащие холестерина, B - липосомы, содержащие холестерин, 1 - группа с липосомами, гомогенизированными с помощью экструдера, а 2 - группа с липосомами, гомогенизированными с помощью обработки ультразвуком.

В результате оказалось, что цитотоксичность, которая проявлялась зависимым от концентрации DDA:DMPC образом, ослаблялась под действием смеси с EG-IM (фиг. 7).

2. Механизм образования вакцины, содержащей липосомальный EG-IM: адсорбция за счет электростатического притяжения.

Смешивали липосомы (LP), рекомбинантный белок gE VZV и EG-IM и центрифугировали (4°C, 100000×g, 1 ч) с тем, чтобы определить, представлен ли механизм образования вакцины с липосомальным EG-IM адсорбцией за счет электростатического притяжения. После отделения супернатанта (S) и осадка (P) осадок полностью суспендировали обработкой ультразвуком в таком же объеме PBS, что и супернатант. Образцы с одинаковым объемом подвергали электрофорезу, а затем окрашивали серебром.

В результате, когда подвергали ультрацентрифугированию только рекомбинантный белок gE VZV, рекомбинантный белок gE обнаруживался в супернатанте. Однако в случае вакцины с липосомальным EG-IM (смесь LP:gE:EG-IM) рекомбинантный белок gE обнаруживался в осадке (фиг. 8). Полагаем, что рекомбинантный белок gE обнаруживается в осадке потому, что рекомбинантный белок gE адсорбируется на липосомах.

3. Иммунологические эффекты вакцин, содержащих липосомальный EG-IM.

(1) Эффект рекрутинга иммунных клеток у липосомального EG-IM.

Вводили липосомальный EG-IM 6-недельным самкам мышей BALB/c внутримышечно, а затем выделяли клетки из мышечной ткани по месту инъекции через 3 ч и 24 ч после введения. Для характеристики иммунных клеток среди выделенных клеток проводили иммуноокрашивание клеток с помощью Ab против CD11b (FITC), Ab против CD11c (FITC), Ab против LybC (PE), Ab против Lyb6G (PE), Ab против F4/80 (PE), Ab против MHCII (PE) и Ab против CD3 (PE) и анализировали их методом проточной цитометрии.

В результате оказалось, что миграция иммунных клеток CD11b⁺ (моноцитов, гранулоцитов), DCs, моноцитов, макрофагов и гранулоцитов в места инъекций усиливалась липосомальным EG-IM (фиг. 9). Это означает, что липосомальный EG-IM инициирует рекрутинг иммунных клеток, что липосомальный EG-IM может индуцировать врожденный иммунитет и что может повышаться захват липосомального

EG-IM иммунными клетками.

(2) Эффект захвата у вакцин, содержащих липосомальный EG-IM.

Белок gE метили флуоресцентным красителем (Alexa647), этим белком gE обрабатывали дендритные клетки (DC) и проводили анализ тех DC, в которых обнаруживалась флуоресценция, методом проточной цитометрии.

В результате флуоресцентные DC не наблюдались, когда белок gE или EG-IM использовали по отдельности, но флуоресцентные DC появлялись, когда в качестве системы адъюванта использовали липосомальный EG-IM (фиг. 10). Это значит, что вакцина, содержащая липосомальный EG-IM, повышает эффективность захвата антигена клетками DC.

Кроме того, рекомбинантный белок gE VZV метили флуоресцентным красителем (Alexa647), а затем смешивали с липосомальным EG-IM для получения вакцины. Полученную вакцину вводили мышам в дельтовидную мышцу бедра и через 4 ч и 24 ч после введения проводили окрашивание флуоресцентным маркером поверхности иммунных клеток в дренирующих лимфатических узлах (dLN) и мышечной ткани, а затем проводили анализ методом проточной цитометрии. Результаты анализа представлены на фиг. 11. На фиг. 11A представлены результаты анализа флуоресцентно меченых специфичных к белку gE клеток в dLN, на фиг. 11B - результаты анализа флуоресцентно меченых специфичных к белку gE клеток в мышечной ткани, на фиг. 11C - результаты измерения флуоресцентно меченых специфичных к белку gE моноцитов в dLN, а на фиг. 11D - результаты измерения флуоресцентно меченых специфичных к белку gE моноцитов в мышечной ткани.

В результате, когда липосомальный EG-IM использовали в качестве системы адъюванта, клетки рекрутировались в dLN и мышечную ткань и активно индуцировался захват вакцины моноцитами по сравнению с тем, когда рекомбинантный белок gE VZV или EG-IM использовали по отдельности (фиг. 11).

(3) Эффект депо у вакцины, содержащей липосомальный EG-IM.

Белок gE метили флуоресцентным красителем (Alexa647) и смешивали с липосомальным EG-IM для получения вакцины. Через 30 мин и 24 ч после введения полученной вакцины мышам в дельтовидную мышцу бедра делали снимки флуоресценции *in vivo* (A) и измеряли флуоресценцию в лимфатических узлах, выделенных из мышей (B).

В результате флуоресценция обнаруживалась по месту инъекции вплоть до 24 ч, как в случае, когда белок gE (антиген) вводили отдельно, так и в случае, когда вводили вакцину, содержащую липосомальный EG-IM (VAC). Проводили анализ флуоресценции у каждого лимфатического узла. В результате флуоресценция обнаруживалась с относительно высокой интенсивностью в поясничных и подколенных узлах. При введении одного лишь антигена интенсивность флуоресценции уменьшалась наполовину через 24 ч, но при введении вакцины, содержащей липосомальный EG-IM, интенсивность флуоресценции не уменьшалась (фиг. 12). Это значит, что вакцина, содержащая липосомальный EG-IM, усиливает эффект депо.

Пример 4. Анализ иммуногенности липосомального EG-IM в составе вакцины против Зика.

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у липосомального EG-IM в составе вакцины против Зика использовали рекомбинантный белок оболочки вируса Зика. В качестве различных иммуноадъювантов 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) дважды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь из рекомбинантного гликопротеина оболочки вируса Зика и квасцов (гидроксид алюминия; Brenntag, Германия), EG-IM или липосомального EG-IM. Что касается вводимого количества, то рекомбинантный гликопротеин оболочки вируса Зика вводили по 2 мкг/мышь, квасцы вводили по 25 мкг/мышь, EG-IM вводили по 0,5 мкг/мышь и липосомальный EG-IM вводили по 25 мкг/мышь. Через две недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки. Выделенные клетки селезенки стимулировали с помощью 5 мкг/мл антигена и культивировали в течение 72 ч. Затем анализировали уровень секретируемого цитокина IFN- γ в культуральной среде клеток с помощью набора для ELISA (R&D Systems, Millipore).

В результате в опытной группе с липосомальным EG-IM повышалась секреция IFN- γ по сравнению с опытной группой с одними квасцами или с одними липосомами (фиг. 13). Таким образом, оказалось, что вакцина против Зика, содержащая липосомальный EG-IM, обладает отличной способностью индуцировать клеточный иммунитет.

Пример 5. Анализ иммуногенности липосомального EG-IM в составе вакцины против вируса японского энцефалита.

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у липосомального EG-IM в составе вакцины против вируса японского энцефалита (JEV) использовали антиген вируса японского энцефалита (JEV). В качестве иммуноадъювантов 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) дважды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь из инактивированного антигена JEV и EG-IM или липосомального EG-IM. Что касается вводимого количества, то инактивированный антиген JEV вводили по 0,5 мкг/мышь, EG-IM вводили по 0,5 мкг/мышь, а липосомальный EG-IM - по 25 мкг/мышь.

1. Измерение титра специфичных к антигену JEV антител.

Через 4 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь

для приготовления проб крови. Для определения титра специфичных к антигену JEV антител в сыворотке после иммунизации использовали метод иммуноферментного анализа до конечной точки разведения. Антиген JEV разбавляли до концентрации 1 мкг/мл, фиксировали на 96-луночном планшете по 100 мкл/лунку (4°C, в течение ночи) и блокировали 300 мкл 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) (комнатная температура, 1 ч). После блокировки трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween-20, а сыворотку, полученную после иммунизации, разбавляли в 10-кратных серийных разведениях и вносили по 100 мкл каждого разведения сыворотки для реакции (37°C, 2 ч). Для идентификации специфичных к антигену JEV антител добавляли конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против IgG мыши (Jackson, 115-035-003), конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против IgG1 мыши (Serotec, STAR132P) и конъюгированное с пероксидазой хрена антитело против IgG2a мыши (Serotec, STAR133P) и проводили реакцию, а затем добавляли ТМВ (тетраметилбензидин, BD BioScience, #55555214) и оставляли реакцию с помощью 1N H₂SO₄. Результаты определения получали путем измерения поглощения при 450 нм и расчета титров антител типа IgG, IgG1 и IgG2a в крови после иммунизации.

В результате в опытной группе с липосомальным EG-IM повышались уровни специфичных к антигену JEV антител типа IgG, типа IgG1 и типа IgG2a по сравнению с опытными группами с одним EG-IM или только с липосомами (Фиг. 14А). Таким образом, вакцина против японского энцефалита по настоящему изобретению, содержащая липосомальный EG-IM, проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

2. Анализ цитокинов.

Через 14 недель после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, а затем эти клетки стимулировали с помощью 1 мкг/мл рекомбинантного гликопротеина JEV. Через 24 ч анализировали клетки, секретирующие цитокин IFN-γ, методом ELISpot ELISA (Millipore).

В результате в опытной группе с липосомальным EG-IM повышалось количество клеток, секретирующих цитокин IFN-γ, по сравнению с опытной группой только с одними липосомами (фиг. 14В). Таким образом, вакцина против японского энцефалита, содержащая липосомальный EG-IM, обладает отличной способностью индуцировать клеточный иммунитет.

Пример 6. Анализ иммуногенности липосомального EG-IM в составе вакцины против туберкулеза.

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у липосомального EG-IM в составе вакцины против туберкулеза (ТВ) использовали рекомбинантные туберкулезные антигены Ag85A, ESAT-6 или HspX по отдельности либо смесь этих трех антигенов. В качестве иммуноадывантов 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) трижды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь рекомбинантных туберкулезных антигенов с EG-IM или с липосомальным EG-IM. Что касается вводимого количества, то рекомбинантные туберкулезные антигены вводили по 5 мкг/мышь, EG-IM вводили по 0,5 мкг/мышь, а липосомальный EG-IM - по 250 мкг/мышь.

1. Измерение титра специфичных к антигенам ТВ антител.

Через 3 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови. Для определения титра специфичных к антигенам ТВ антител в сыворотке после иммунизации использовали метод иммуноферментного анализа до конечной точки разведения. Результаты определения получали путем измерения поглощения при 450 нм и расчета титров антител типа IgG в крови после иммунизации.

В результате при использовании Ag85A, ESAT-6 или HspX по отдельности либо в виде смеси этих трех антигенов в опытной группе с липосомальным EG-IM повышались уровни специфичных к рекомбинантным антигенам ТВ антител типа IgG по сравнению с опытной группой с одним лишь EG-IM (фиг. 15А). Таким образом, вакцина против туберкулеза по настоящему изобретению, содержащая липосомальный EG-IM, проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

2. Анализ цитокинов.

Через 3 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, а затем эти клетки стимулировали с помощью 1 мкг/мл рекомбинантного белка gE ТВ и культивировали в течение 24 ч. Затем анализировали клетки, секретирующие цитокин IFN-γ, методом ELISpot ELISA (Millipore).

В результате во всех случаях, когда использовался антиген Ag85A, ESAT-6 или HspX, в опытной группе с липосомальным EG-IM повышалось количество клеток, секретирующих цитокин IFN-γ, по сравнению с опытной группой с одним EG-IM (Фиг. 15В). Таким образом, вакцина против туберкулеза по настоящему изобретению, содержащая липосомальный EG-IM, проявляет способность индуцировать клеточный иммунитет.

3. Анализ бактерицидного действия.

Клетки селезенки из иммунизованных мышей культивировали совместно с BCG-инфицированными макрофагами. После 7-дневного культивирования клетки выделяли, лизировали и высевали на чашки с агаром Bacto Middlebrook 7H11 (Difco), содержащие обогащение Middlebrook OADC (Difco). После культивирования при 37°C в течение 4 недель подсчитывали количество образовавшихся бактериальных колоний.

В результате оказалось, что в опытной группе с липосомальным EG-IM проявляется превосходное бактерицидное действие на БЦЖ по сравнению с опытной группой с одним EG-IM (фиг. 15С).

Пример 7. Анализ иммуногенности липосомального EG-IM в составе вакцины против коклюша.

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у липосомального EG-IM в составе вакцины против коклюша использовали бесклеточный вакцинный антиген коклюша (aP). В качестве иммуноадьювантов 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) дважды с интервалом в две недели вводили внутримышечно смесь из бесклеточного вакцинного антигена коклюша (aP) с EG-IM или с липосомальным EG-IM. Что касается вводимого количества, то антиген aP вводили по 5 мкг/мышь, липосомы вводили по 25 мкг/мышь, EG-IM - по 0,5 мкг/мышь, а липосомальный EG-IM - по 25 мкг/мышь.

1. Измерение титра специфичных к антигену aP антител.

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали и брали у них сердечную кровь для приготовления проб крови. Для определения титра специфичных к антигену aP антител в сыворотке после иммунизации использовали метод иммуноферментного анализа до конечной точки разведения. Результаты определения получали путем измерения поглощения при 450 нм и расчета титра антител типа IgG в крови после иммунизации.

В результате в опытной группе с липосомальным EG-IM повышалась продукция специфичных к антигену aP антител типа IgG по сравнению с опытными группами с одним EG-IM или только с липосомами (фиг. 16А). Таким образом, вакцина против коклюша по настоящему изобретению, содержащая липосомальный EG-IM, проявляет отличное иммунное действие, то есть эффективность в качестве вакцины.

2. Анализ пролиферации Т-клеток CD4⁺.

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали и извлекали ткани селезенки, стимулировали с помощью 5 мкг антигена aP и культивировали в течение 0, 4 и 8 дней. Затем определяли пролиферацию Т-клеток CD4⁺ методом проточной цитометрии.

В результате оказалось, что в опытной группе с липосомальным EG-IM эффективность пролиферации Т-клеток CD4⁺ была самой высокой по сравнению с опытными группами с одним EG-IM или только с липосомами (фиг. 16В).

3. Анализ цитокинов.

Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и легких и разделяли на отдельные клетки, а затем эти клетки стимулировали с помощью 5 мкг/мл антигена aP и культивировали в течение 24 ч. Затем анализировали клетки, секретирующие цитокин IFN- γ , методом ELISpot ELISA (Millipore). Светлые столбики представляют результаты по клеткам селезенки, а темные столбики - результаты по клеткам легких. Кроме того, клетки селезенки стимулировали с помощью 5 мкг/мл антигена aP и культивировали в течение 72 ч, а затем анализировали секрецию цитокина IFN- γ методом сэндвич-ELISA (R&D Systems).

В результате в опытной группе с липосомальным EG-IM повышалось количество клеток, секретирующих IFN- γ , по сравнению с опытной группой с одним EG-IM или только с липосомами (фиг. 17А). Кроме того, в опытной группе с липосомальным EG-IM проявлялась превосходная способность к секреции цитокинов IFN- γ и IL-17 (фиг. 17В и 17С). Кроме того, вакцина против коклюша по настоящему изобретению, содержащая липосомальный EG-IM, проявляет отличную способность индуцировать клеточный иммунитет.

Пример 8. Анализ иммуногенности липосомального EG-IM в составе вакцины против вируса ветряной оспы.

Для идентификации эффекта усиления иммуногенности у липосомального EG-IM в составе вакцины против вируса ветряной оспы использовали рекомбинантный антиген gE вируса ветряной оспы (VZV). Для получения модели с примириванием 6-недельным мышам C57BL/6 (SLC, Япония) вводили подкожно аттенуированный VZV. Через 4 недели 6-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) дважды с интервалом в две недели внутримышечно вводили вакцину против вируса ветряной оспы (VZV), полученную при смешивании рекомбинантного антигена gE VZV с квасцами, EG-IM или липосомальным EG-IM в качестве иммуноадьювантов. Что касается вводимого количества, то рекомбинантный антиген gE VZV вводили по 5 мкг/мышь, EG-IM вводили по 2 или 3 мкг/мышь, а липосомальный EG-IM - по 50 мкг/мышь. В качестве контрольной группы коммерчески доступную вакцину Zostavax (Merck, США) разбавляли до 1/10 дозы для человека и вводили один раз мышам. Кроме того, проводили сравнение в условиях с изменением состава липосом, которые являются ингредиентом липосомального EG-IM, на соотношение DOTAP:DMPC=1:1 или DODAP:DMPC=1:2.

1. Анализ цитокинов.

Через 4 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки, а затем эти клетки стимулировали с помощью 1000 PFU/мл Zostavax (аттенуированный вирус) или 4 мкг/мл смеси пептидов gE и культивировали в течение 72 ч. Затем анализировали секрецию цитокина IFN- γ в культуре клеток с помощью набора для ELISA (R&D Systems). А также отдельно стимулировали клетки селезенки с помощью 1000 PFU/мл Zostavax (аттенуированный вирус) или 4 мкг/мл смеси пептидов gE. Через 24 ч анализировали клетки, секретирующие цитокин IFN-

γ, методом ELISpot ELISA (Millipore).

В результате в опытной группе с липосомальным EG-IM повышалась секреция IFN-γ по сравнению с опытной группой с одним EG-IM, а также по сравнению с Zostavax (Merck, США), коммерчески доступной вакциной (фиг. 18). Таким образом, вакцина против вируса ветряной оспы по настоящему изобретению, содержащая липосомальный EG-IM, проявляет отличную способность индуцировать клеточный иммунитет.

2. Анализ синергического эффекта при добавлении в состав липидов.

В состав липосомального EG-IM еще добавляли холестерин (chol), сквален или трикаприн в качестве липидных ингредиентов с тем, чтобы установить, будет ли возникать синергический эффект. Каждую из вакцин вводили внутримышечно дважды с интервалом в 2 недели, а через 2 или 4 недели после последнего введения мышей анестезировали и извлекали ткани селезенки, стимулировали с помощью 10 мкг/мл рекомбинантного gE VZV и культивировали в течение 72 ч. Затем анализировали секрецию цитокина IFN-γ в клеточной культуре с помощью набора для ELISA (R&D Systems). А также отдельно стимулировали клетки селезенки с помощью 4 мкг/мл смеси пептидов gE и культивировали в течение 24 ч. Затем анализировали клетки, секретирующие цитокин IFN-γ, с помощью набора для ELISpot (Millipore).

В результате секреция IFN-γ повышалась при липосомальном EG-IM, содержащем дополнительно холестерин (фиг. 19), сквален (фиг. 20) или трикаприн (фиг. 21). Таким образом, оказалось, что вакцина, дополнительно содержащая холестерин, сквален или трикаприн в качестве дополнительных липидных ингредиентов в составе липосомального EG-IM, проявляет лучшую способность индуцировать клеточный иммунитет по сравнению с тем, когда использовался только один липосомальный EG-IM.

3. Анализ синергического эффекта при добавлении иммуноадьюванта.

Проверяли, будет ли возникать синергический эффект при дальнейшем добавлении Quil A, вещества на основе сапонина, в качестве дополнительного адьюванта к липосомальному EG-IM. Каждую вакцину вводили внутримышечно дважды с интервалом в 2 недели. Через 4 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки. Клетки стимулировали с помощью 4 мкг/мл смеси рекомбинантных пептидов gE VZV или 1000 PFU/мл Zostavax и культивировали в течение 24 ч. Затем анализировали клетки, секретирующие цитокин IFN-γ, с помощью набора для ELISpot (Millipore).

В результате секреция IFN-γ повышалась при липосомальном EG-IM, содержащем дополнительно производное сапонина - вещество Quil A (фиг. 22). Таким образом, оказалось, что вакцина, дополнительно содержащая производное сапонина вещество в качестве дополнительного усилителя иммунитета наряду с липосомальным EG-IM, проявляет лучшую способность индуцировать клеточный иммунитет по сравнению с тем, когда использовался только один EG-IM.

4. Анализ синергического эффекта в зависимости от состава.

Для того, чтобы определить отличия по иммуногенности в зависимости от конечной формулы вакцины против вируса ветряной оспы (VZV), проводили эксперименты на простой смешанной вакцине (+) и смешанной и лиофилизованной вакцине (/). Каждую вакцинную композицию вводили внутримышечно 7-недельным мышам BALB/c (SLC, Япония) дважды с интервалом в две недели. Через 2 недели после последнего введения мышей анестезировали, извлекали ткани селезенки и разделяли на отдельные клетки. Клетки стимулировали с помощью 5 мкг/мл рекомбинантного антигена gE VZV и культивировали в течение 72 ч. Затем анализировали уровни секреции цитокинов IL-5 и IFN-γ в культуральной среде клеток методом сэндвич-ELISA (R&D Systems; DY485, DY405).

На фиг. 23 NP-A означает DOTAP/DOPC, NP-B означает DOTAP/DMPC, NP-C - DOTAP/DMPC/сквален, NP-D - DOTAP/DMPC/трикаприн, + означает простую смешанную форму, а / означает смешанную и лиофилизованную форму.

В результате форма, полученная при лиофилизации липосомального EG-IM с антигеном, усиливала секрецию IFN-γ в наибольшей степени, но почти не усиливала секрецию IL-5 (фиг. 23). Таким образом, оказалось, что форма, полученная при лиофилизации липосомального EG-IM с антигеном, проявляет отличную способность индуцировать клеточный иммунитет типа Th1.

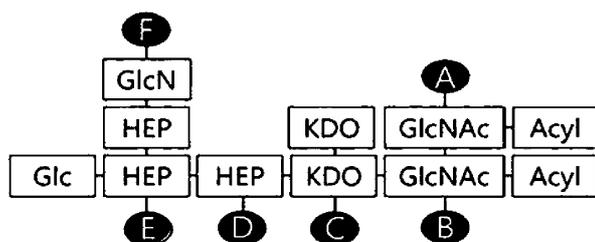
Промышленная применимость

Настоящее изобретение преодолевает физико-химическую нестабильность липосом и поэтому дает преимущества в отношении производства, доставки и хранения и имеет преимущества в качестве системы иммунной доставки благодаря улучшению стабильности. Кроме того, в настоящем изобретении содержится весь антиген, иммуномодулятор и катионная липосома, поэтому проявляется лучшая эффективность усиления иммунитета по сравнению с тем, когда применяется только иммуномодулятор.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для усиления иммунитета, включающая

(а) иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1:



[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат; и

(b) катионную липосому.

2. Композиция по п.1, при этом фосфат связывается в положениях, выбранных из группы, состоящей из AB, AC, AD, AE, AF, BC, BD, BE, BF, CD, CE, CF, DE, DF, EF, ABC, ABD, ABE, ABF, ACD, ACE, ACF, ADE, ADF, AEF, BCD, BCE, BCF, BDE, BDF, BEF, CDE, CDF, CEF, DEF, ABCD, ABCE, ABCF, ABDE, ABDF, ABEF, ACDE, ACDF, ADEF, BCDE, BCDF, BCEF, BDEF, CDEF, ABCDE, ABCEF и ABCDEF в формуле 1.

3. Композиция по п.1, при этом катионная липосома представляет собой катионный липид, выбранный из группы, состоящей из диметилдикодециламмонийбромида (DDA), 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропана (DOTAP), 3β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерина (DC-Chol), 1,2-диолеилокси-3-диметиламмонийпропана (DODAP), 1,2-ди-О-октадецил-3-триметиламмонийпропана (DOTMA), 1,2-димиристолеил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 14:1), 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 16:0-18:1), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 18:1), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 18:0), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 16:0), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 14:0), 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-этилфосфохолина (этил-PC 12:0), N1-[2-((1S)-1-[(3-аминопропил)амино]-4-[ди(3-аминопропил)амино]бутилкарбоксамидо)этил]-3,4-ди[олеилокси]бензамида (MVL5), 1,2-димиристоил-3-диметиламмоний-пропана (DAP 14:0), 1,2-дипальмитоил-3-диметиламмоний-пропана (DAP 16:0), 1,2-дистеароил-3-диметиламмоний-пропана (DAP 18:0), N-(4-карбоксивензил)-N,N-диметил-2,3-бис(олеилокси)пропан-1-аминия (DOBAQ), 1,2-стеароил-3-триметиламмоний-пропана (TAP 18:0), 1,2-дипальмитоил-3-триметиламмоний-пропана (TAP 16:0), 1,2-димиристоил-3-триметиламмоний-пропана (TAP 14:0) и N4-холестерил-спермина (GL67).

4. Композиция по п.3, при этом катионная липосома дополнительно содержит нейтральный липид, выбранный из группы, состоящей из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфорилхолина (DMPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamina (DOPE), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DLPC), фосфоэтанолamina (PE) и фосфатидилхолина (PC).

5. Вакцинная композиция, включающая

(a) антиген;

(b) композицию для усиления иммунитета по п.1 в качестве активного ингредиента.

6. Вакцинная композиция по п.5, при этом антиген выбран из группы, состоящей из пептида, белка, нуклеиновой кислоты, сахара, патогена, аттенуированного патогена, инактивированного патогена, вируса, вирусоподобных частиц (VLP), клеток или фрагментов клеток.

7. Вакцинная композиция по п.5, при этом антиген выбран из группы, состоящей из антигена вируса Зика, антигена вируса японского энцефалита, антигена *Mycobacterium tuberculosis*, антигена коклюша, антигена вируса ветряной оспы, антигена *Haemophilus influenzae* типа B (HIB), антигена вируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS), антигена *Pseudomonas aeruginosa*, антигена сибирской язвы, антигена вируса гепатита A (HAV), антигена вируса гепатита B (HBV), антигена вируса гепатита C (HCV), антигена вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), антигена вируса *Herpes simplex* (HSV), антигена *Neisseria meningitidis*, антигена *Corynebacterium diphtheria*, антигена *Bordetella pertussis*, антигена *Clostridium tetani*, антигена вируса папилломы человека (HPV), антигена энтерококков, антигена *Staphylococcus aureus*, антигена *Klebsiella pneumoniae*, антигена *Acinetobacter baumannii*, антигена *Enterobacter*, антигена *Helicobacter pylori*, антигена малярии, антигена вируса денге, антигена *Orientia tsutsugamushi*, антигена буньявируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), антигена коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), антигена вируса гриппа, антигена вируса Эбола и антигена *Diplococcus pneumoniae*.

8. Вакцинная композиция по п.5, при этом вакцина представляет собой инактивированную вакцину, аттенуированную вакцину, субъединичную вакцину, конъюгатную вакцину, рекомбинантную вакцину, моновалентную вакцину, поливалентную вакцину или смешанную вакцину.

9. Вакцинная композиция по п.5, при этом вакцина выбрана из группы, состоящей из вакцины против вируса Зика, вакцины против японского энцефалита, вакцины против туберкулеза, вакцины против коклюша, вакцины против вируса ветряной оспы (VZV), вакцины против *Haemophilus influenzae* типа B,

вакцины против MERS, вакцины против *Pseudomonas aeruginosa*, вакцины против рака, вакцины против сибирской язвы, вакцины против HAV, вакцины против HBV, вакцины против HCV, вакцины от ВИЧ, менингококковой вакцины, вакцины против дифтерии, вакцины против столбняка, вакцины против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, вакцины против энтерококков, вакцины против *Staphylococcus aureus*, вакцины против *Klebsiella pneumoniae*, вакцины против *Acinetobacter baumannii*, вакцины против *Enterobacter*, вакцины против *Helicobacter pylori*, вакцины против малярии, вакцины против вируса денге, вакцины против *Orientia tsutsugamushi*, вакцины против буньявируса тяжелой лихорадки с синдромом тромбоцитопении (SFTS), вакцины против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), вакцины против вируса Эбола, вакцины против вируса гриппа и вакцины против *Diplococcus pneumoniae*.

10. Вакцинная композиция по п.5, при этом вакцина является лиофилизованной.

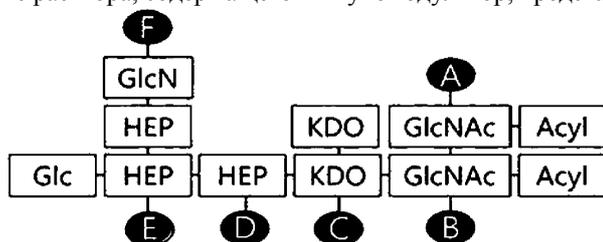
11. Вакцинная композиция по п.9, при этом вакцина против вируса ветряной оспы (VZV) находится в готовом к применению виде.

12. Вакцинная композиция по п.5, при этом вакцина дополнительно содержит холестерин, сквален или трикаприн.

13. Вакцинная композиция по п.5, при этом вакцина дополнительно содержит сапонин, Quil A или QS21 в качестве вещества - производного сапонина.

14. Способ получения композиции для усиления иммунитета по п.1, включающий

(a) приготовление раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1



[Формула 1]

где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат;

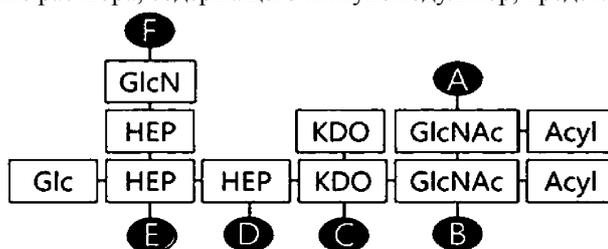
(b) растворение липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов;

(c) лиофилизацию смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя;

(d) регидратацию вещества, полученного на стадии (c), а затем смешивание этого вещества с раствором из стадии (a), получая при этом композицию для усиления иммунитета.

15. Способ получения вакцинной композиции по п.5, включающий

(a) приготовление раствора, содержащего иммуномодулятор, представленный следующей формулой 1



[Формула 1]

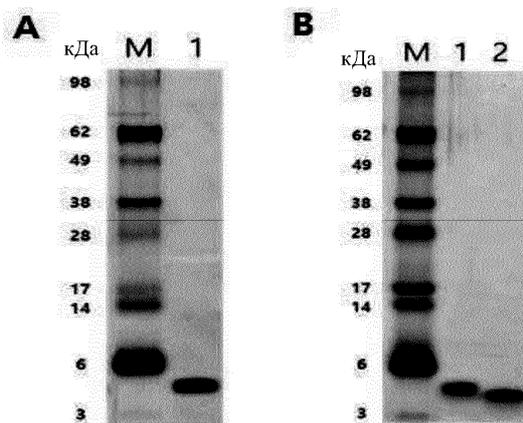
где Glc - глюкоза, GlcN - глюкозамин, HEP - гептоза, KDO - 2-кето-3-дезоксиктонат, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, а A-F - положения, с которыми может связываться фосфат;

(b) растворение липидов в органическом растворителе с получением смешанного раствора липидов;

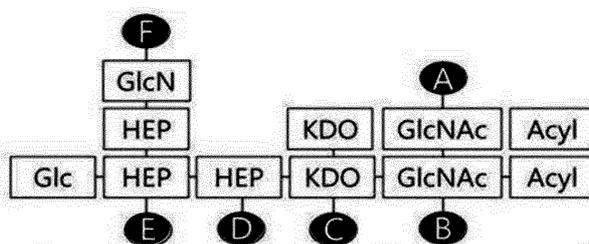
(c) лиофилизацию смешанного раствора липидов из стадии (b) для удаления органического растворителя;

(d) регидратацию вещества, полученного на стадии (c), получая при этом липосомы;

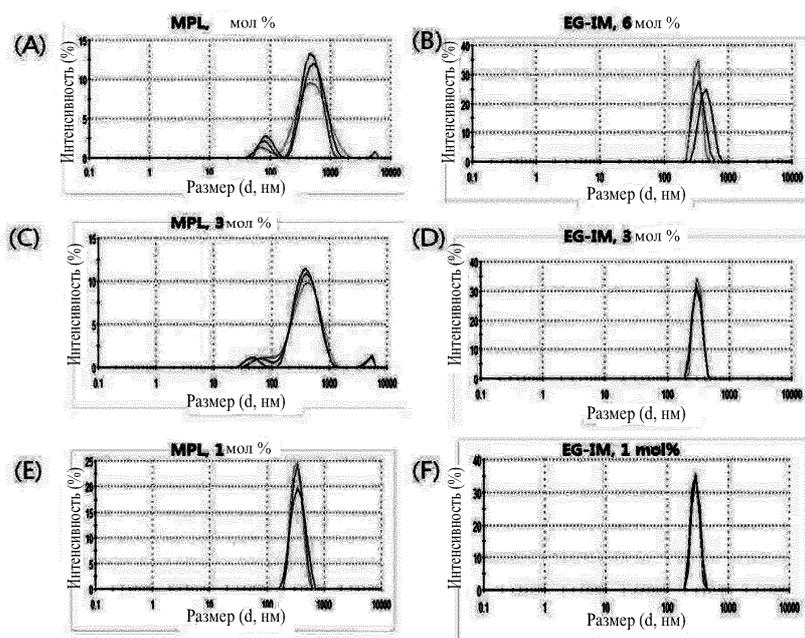
(e) добавление раствора из стадии (a) и антигена к липосомам из стадии (d) с последующей повторной лиофилизацией.



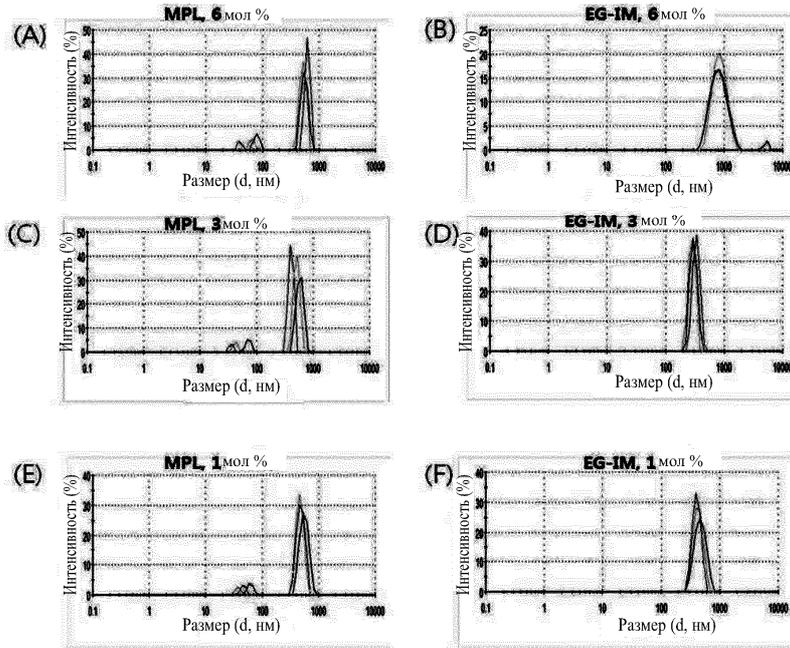
Фиг. 1



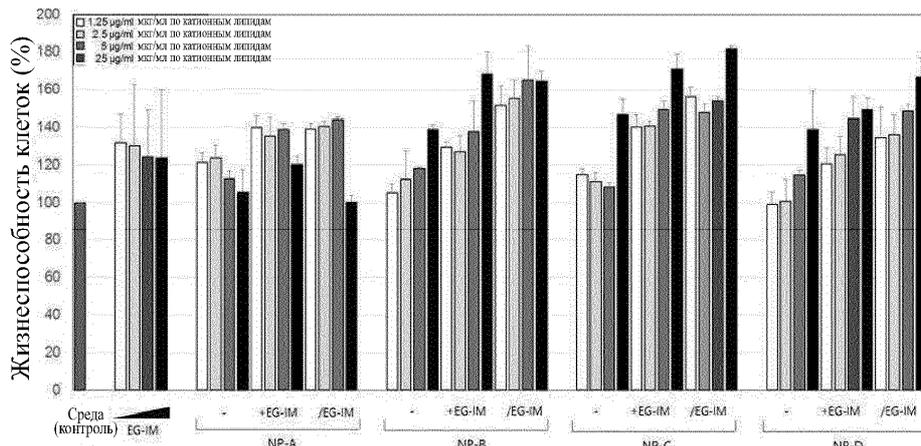
Фиг. 2



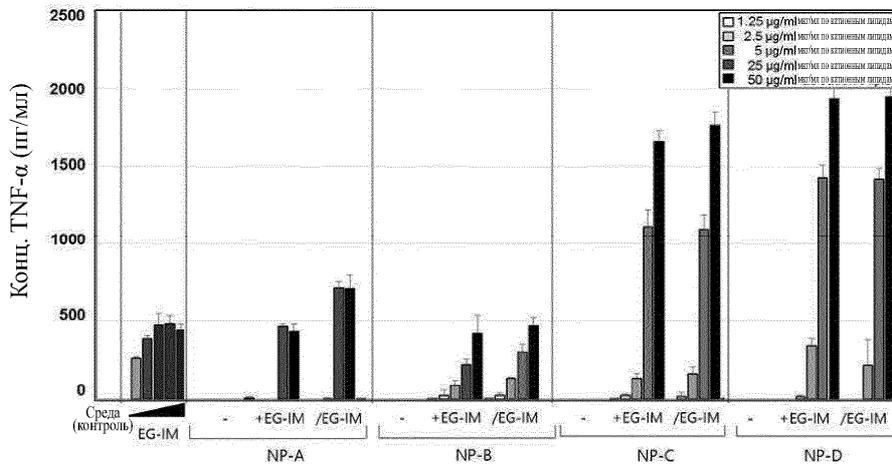
Фиг. 3



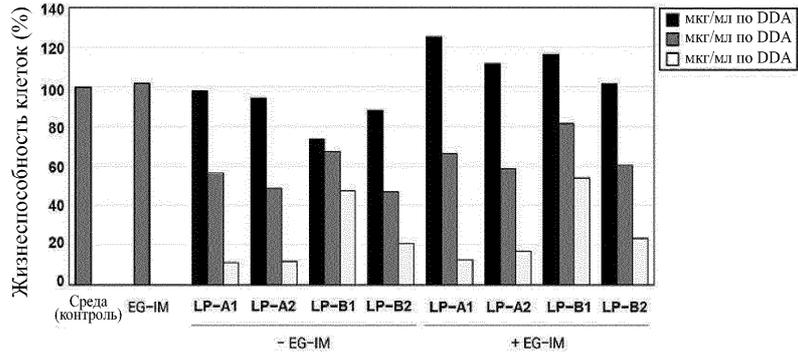
Фиг. 4



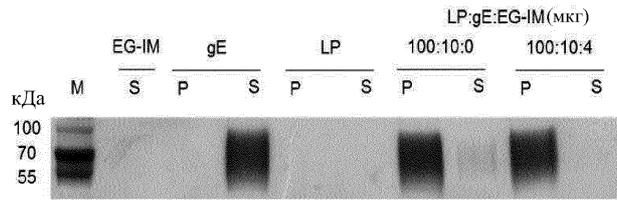
Фиг. 5



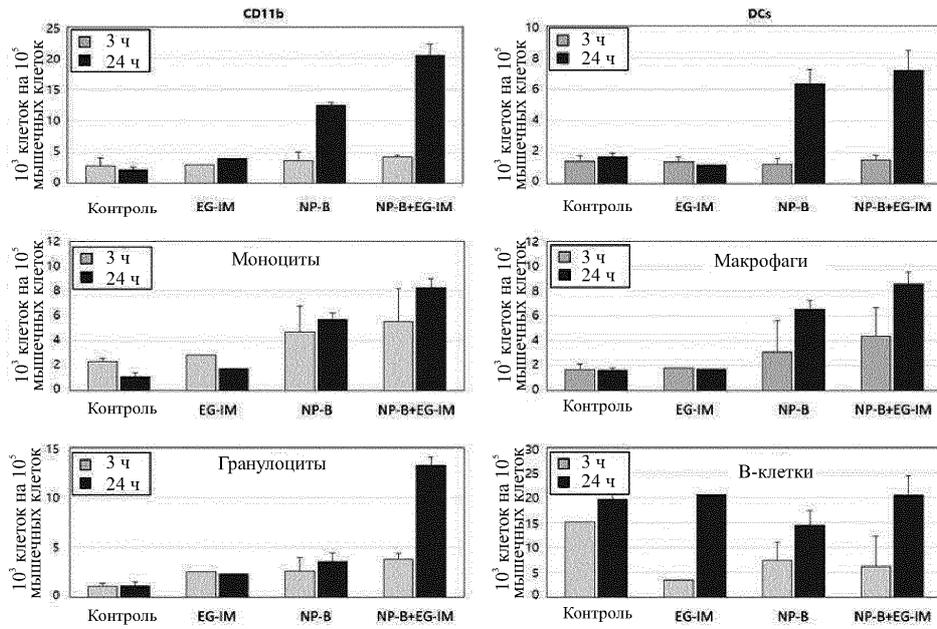
Фиг. 6



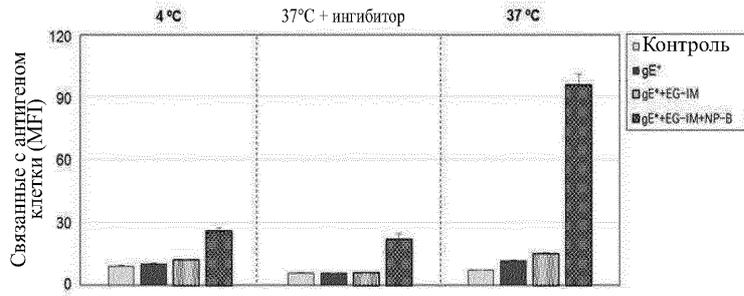
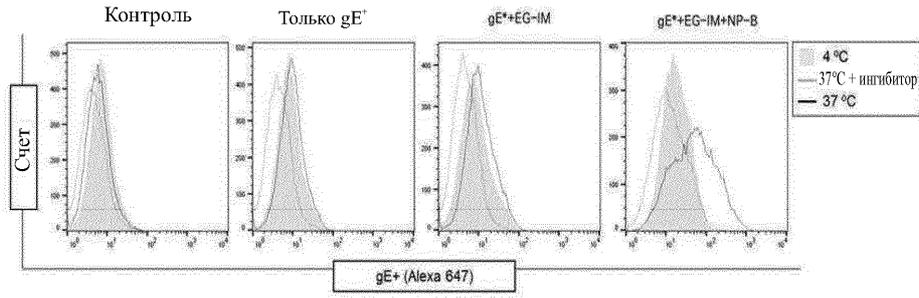
Фиг. 7



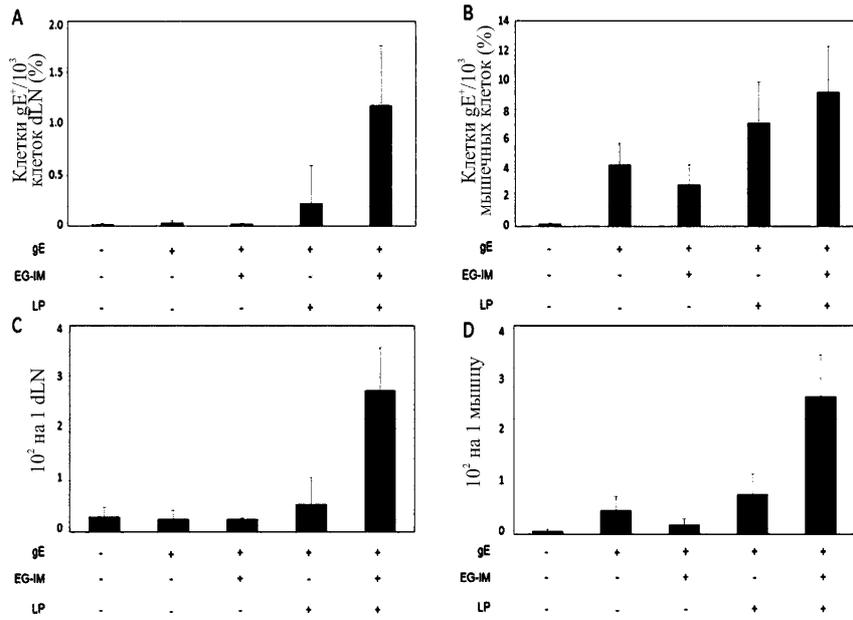
Фиг. 8



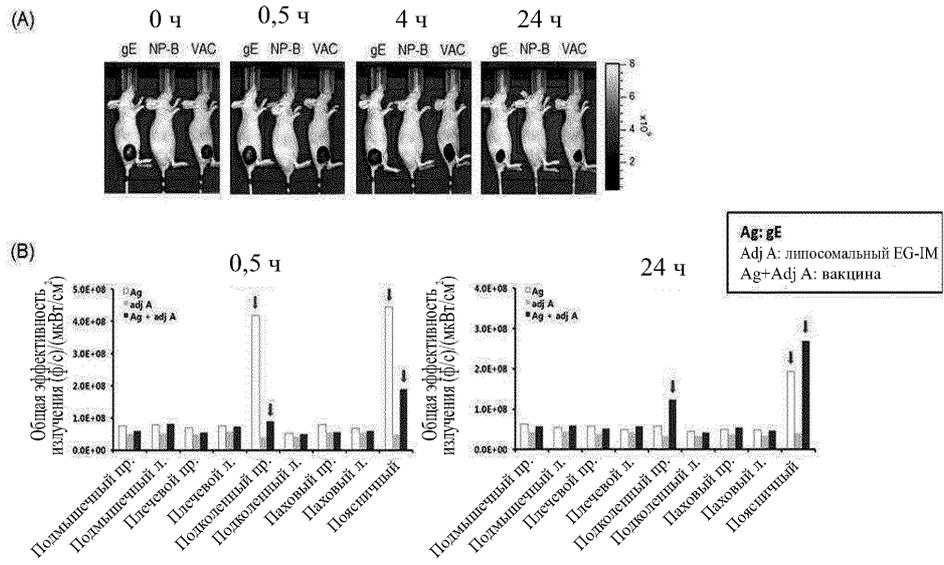
Фиг. 9



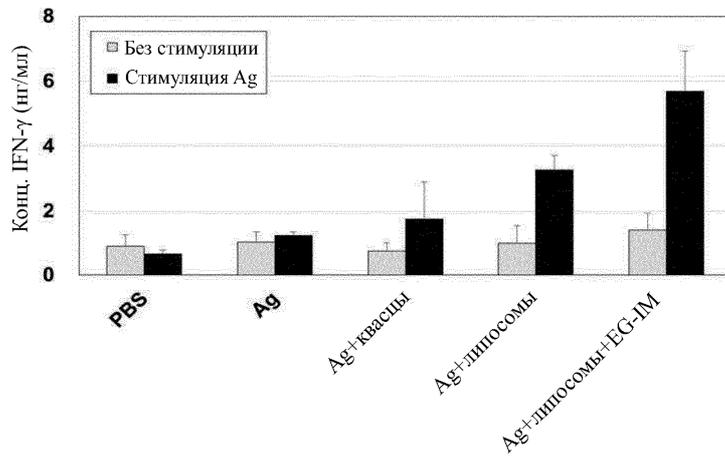
Фиг. 10



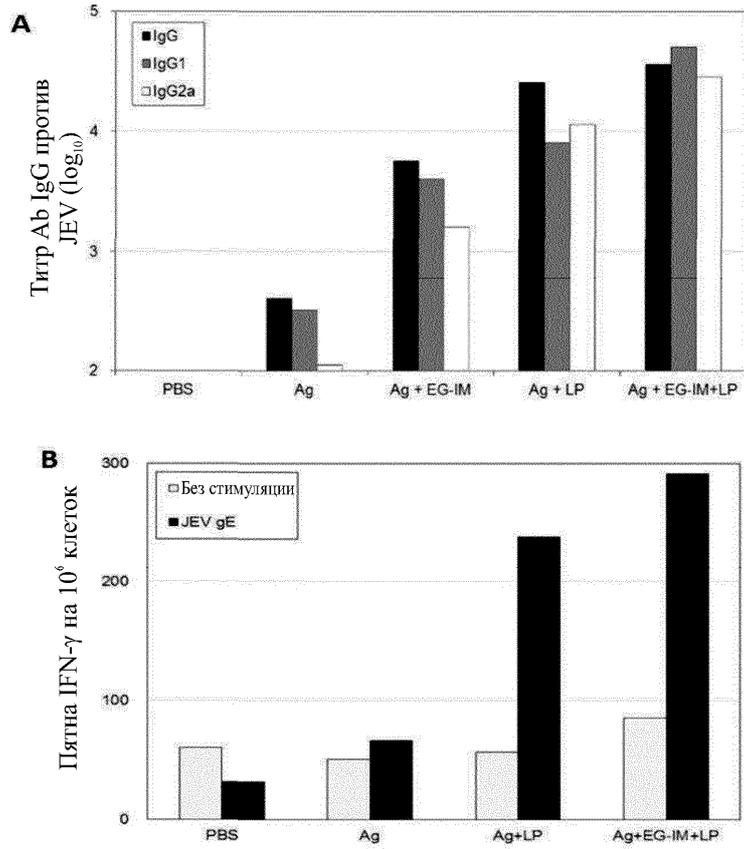
Фиг. 11



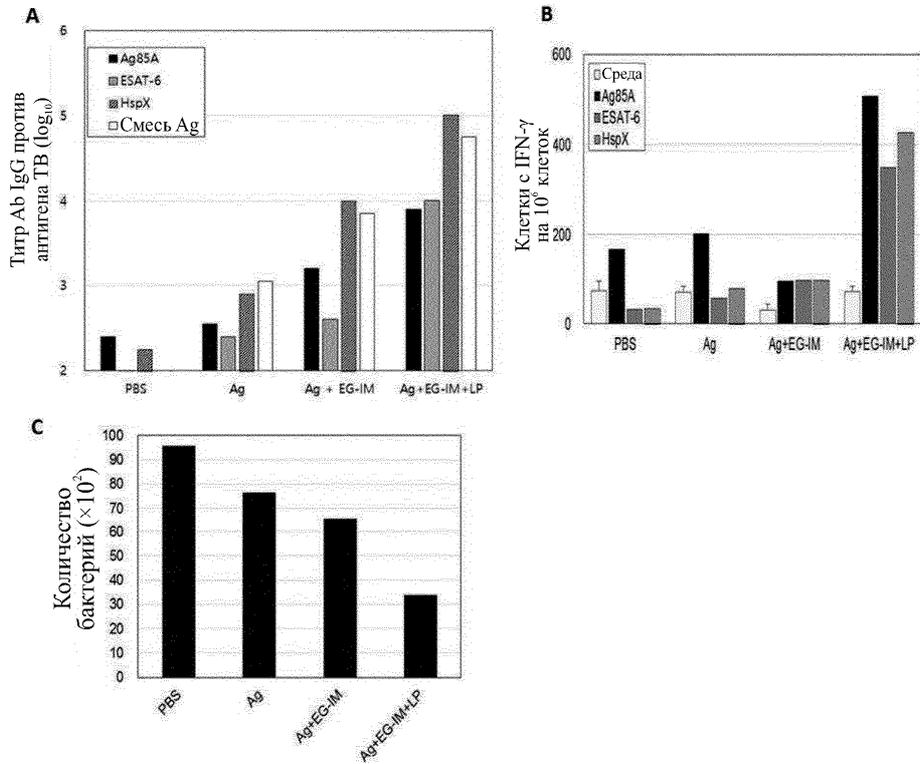
Фиг. 12



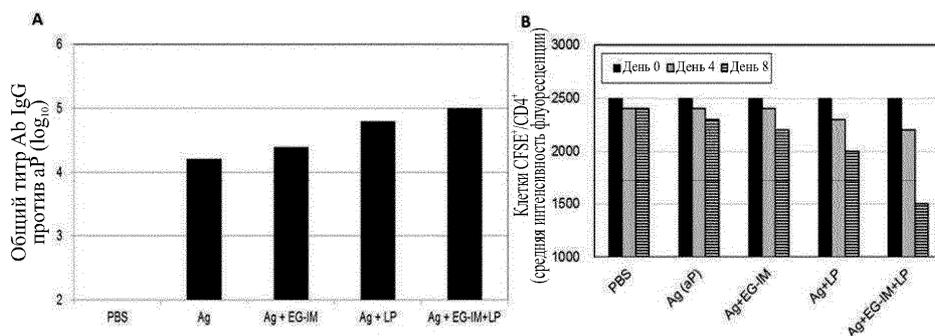
Фиг. 13



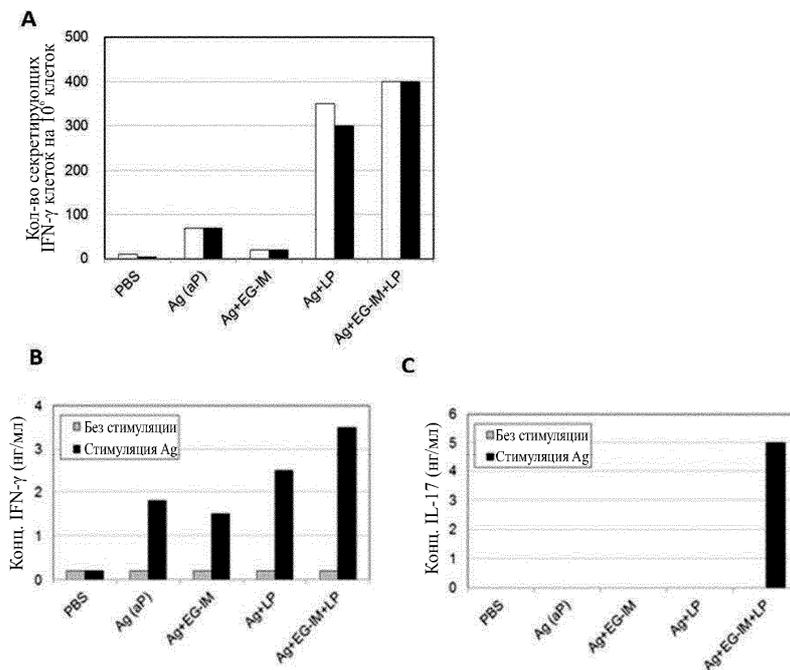
Фиг. 14



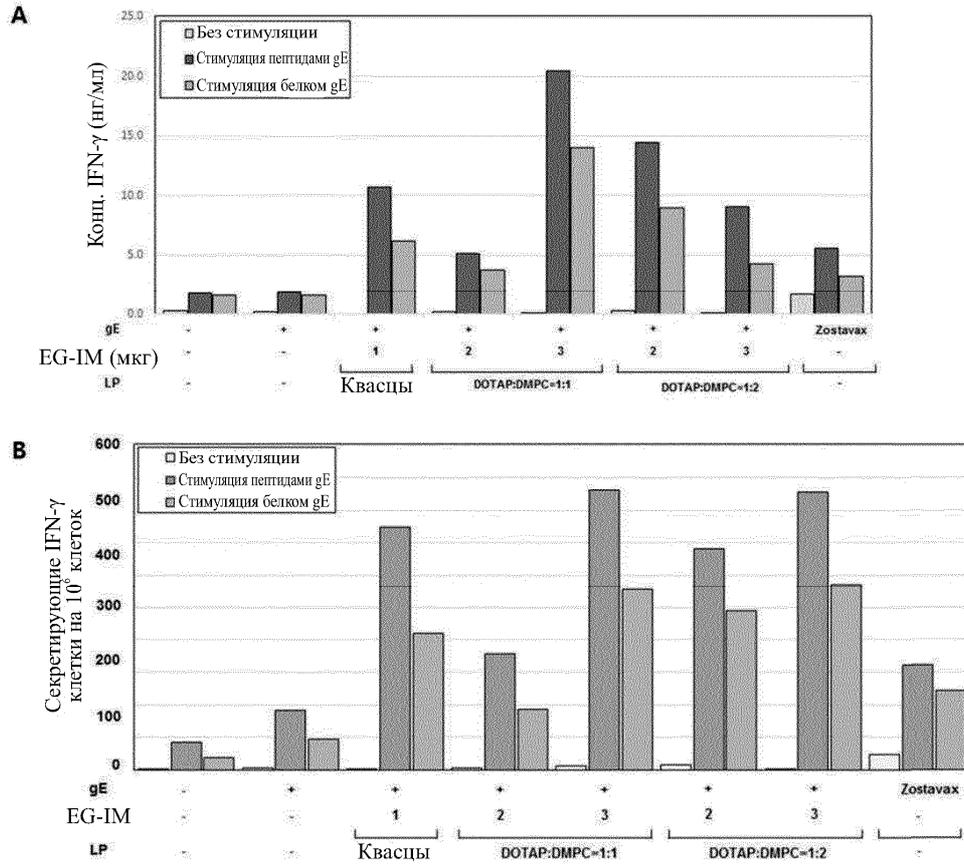
Фиг. 15



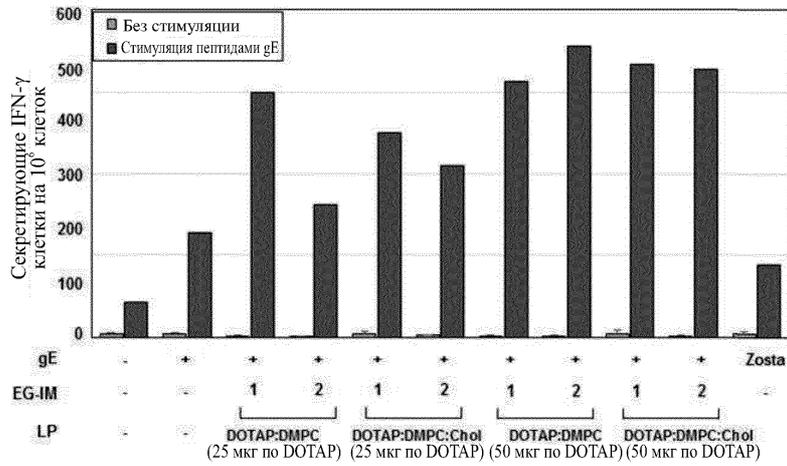
Фиг. 16



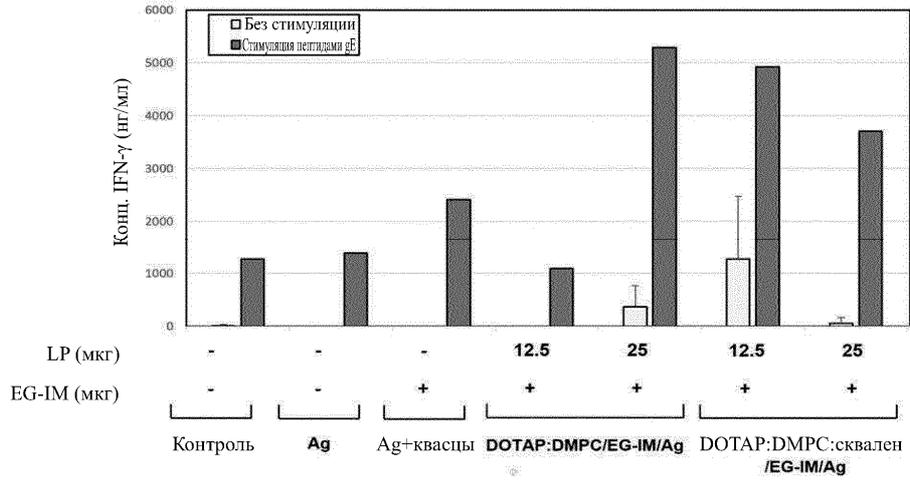
Фиг. 17



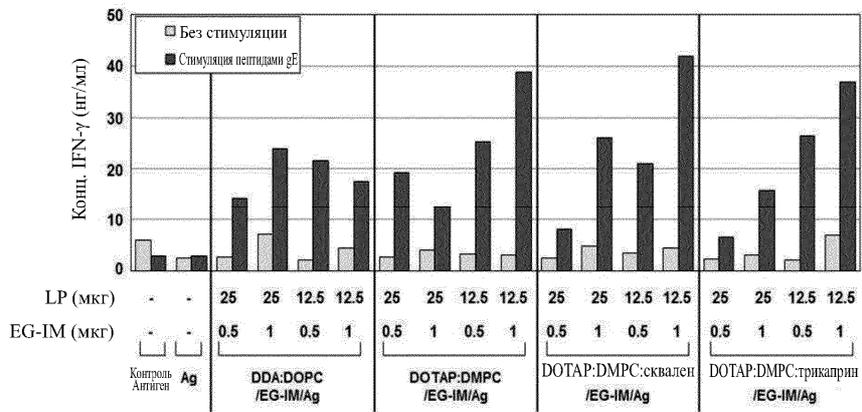
Фиг. 18



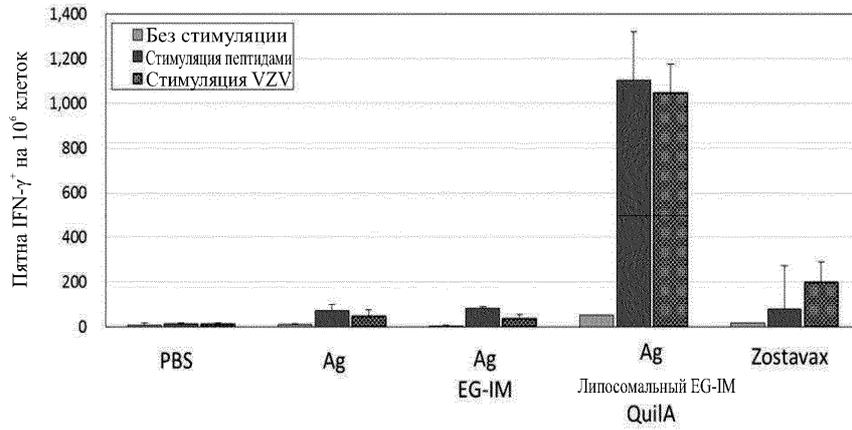
Фиг. 19



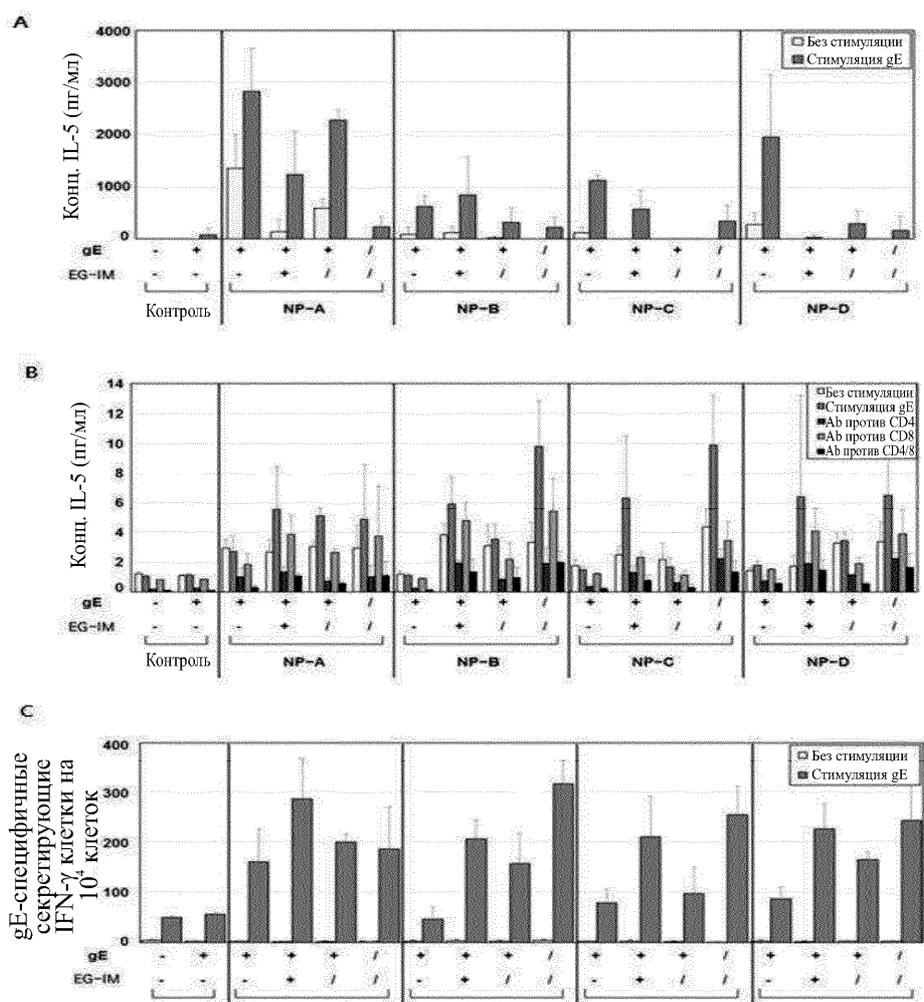
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2