

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290435** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2022.12.23(22) Дата подачи заявки
2020.08.13(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)(54) **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА И ЕГО ПУТЬ ВВЕДЕНИЯ**

(31) 62/886,234

(32) 2019.08.13

(33) US

(86) PCT/US2020/046175

(87) WO 2021/030582 2021.02.18

(88) 2021.03.18

(71) Заявитель:
АЛТИММУН, ИНК. (US)

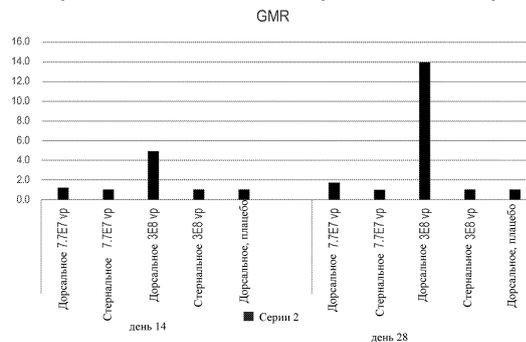
(72) Изобретатель:

**Кришнан Виджаянтхи, Робертс М.
Скот (US)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Джермакян Р.В., Парамонова К.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(57) Изобретение относится к способам вызова защитного иммуногенного ответа посредством интраназального введения иммуногенной композиции (например, вакцины)/терапевтической иммуногенной композиции субъекту-млекопитающему. Определенные положения дозирования субъекта в ходе введения иммуногенных агентов, например, когда ноздри направлены вверх в модифицированном положении сидя, полулежа и/или лежа на спине, неожиданно коррелируют с формированием сильного иммуногенного ответа как у людей, так и у животных.

**A1****202290435****202290435****A1**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА И ЕГО ПУТЬ ВВЕДЕНИЯ

Описание

Ссылка на родственную заявку

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента США № 62/886234, поданной 13 августа 2019 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0002] Настоящее изобретение в общем относится к введению, связанному с положением, дозы интраназальной иммуногенной композиции (например, вакцины) при терапевтической дозе.

Федеральная поддержка исследования или разработки

[0003] Настоящее изобретение было создано при поддержке правительства согласно договору HNSO100201600008C, заключенному с Управлением передовых биомедицинских исследований и разработок США (BARDA). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0004] Сибирская язва представляет собой острое и тяжелое заболевание, вызываемое продуцирующей токсин палочковидной грамположительной аэробной бактерией *Bacillus anthracis*. Инфекция сибирской язвы передается через споры, стабильные в окружающей среде, которые прорастают после инокуляции, проглатывания или вдыхания с проявлениями заболевания, зависящими от пути заражения (кожная, желудочно-кишечная или легочная форма сибирской язвы). Сообщается о более 90% случаев летальности для легочной формы (Wright JG, Quinn CP, Shadomy S, et al. Use of anthrax immunogenic composition (e.g., vaccine) in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. MMWR Recomm Rep. 2010;59(RR-6):1–30).

[0005] *B anthracis* продуцирует летальные токсины, состоящие из 3 белков, известных как протективный антиген (PA), фактор летальности (LF) и фактор отека (EF). PA связывается с клетками-хозяевами и объединяется с LF или EF с образованием

летального токсина (LT) и токсина отека (ET), соответственно [Wright 2010]. РА является компонентом обоих токсинов, а антитела против РА имеют решающее значение для защиты от заболевания сибирской язвы.

[0006] *B anthracis* встречается в природе в почве и вызывает инфекции у животных, особенно у крупных травоядных. Естественное заражение человека, как правило, происходит после контакта с инфицированными животными или шкурами животных, однако, крайне редко в Соединенных Штатах Америки. Сибирская язва считается одним из наиболее вероятных агентов, которые могут быть использованы при биотеррористической атаке, поскольку споры очень легко выращивать в лаборатории, легко рассеивать и сохранять устойчивость в течение длительного времени в окружающей среде (Anthrax: The threat. Centers for Disease Control and Prevention Web site, September 2017). В 2001 году 5 из 22 человек, зараженных сибирской язвой, доставленных через почтовую систему США в результате акта биотерроризма, погибли.

[0007] Единственной иммуногенной композицией (например, вакциной), зарегистрированной в настоящее время для профилактики сибирской язвы в США, является BioThrax (иммуногенная композиция (например, вакцина) против сибирской язвы, адсорбированная, AVA), производимая компанией Emergent BioSolutions (Lansing, MI). Данная иммуногенная композиция (например, вакцина) представляет собой стерильный продукт, изготовленный из бесклеточных фильтратов культур штамма *B. anthracis*, не способного вызывать заболевание. Схема профилактики до воздействия включает внутримышечное введение 3 доз в возрасте 0, 1 и 6 месяцев. Для постоянной защиты рекомендуют бустерные дозы в возрасте 12 месяцев, 18 месяцев и ежегодно. Схема профилактики после подвергания заболеванию включает введение 3 доз подкожно через 0, 2 и 4 недели после воздействия в сочетании с антимикробной терапией. Эти схемы иммунизации являются неудобными, времязатратными и связаны со значительной реактогенностью. В стратегии и плане реализации организации по чрезвычайным медицинским мерам общественного здравоохранения (PHEMCE) 2016 г. определено, что подход к медицинским контрмерам включает разработку иммуногенной композиции второго поколения (например, вакцины) против *B anthracis* (U.S. Department of Health and Human Services. 2016 Public health emergency medical countermeasures enterprise (PHEMCE) strategy and implementation plan. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, 2016).

[0008] Военнослужащие, другие лица, оказывающие первую помощь, ветеринары и другие работники животноводства вакцинируются до воздействия по обычному или доконтактному календарю. В случае биологического оружия или другого воздействия

Центры США по контролю и профилактике заболеваний (CDC) рекомендуют, чтобы не вакцинированные индивидуумы получали антибиотики, такие как ципрофлоксацин или доксициклин, для предположительного лечения вегетативных форм *B anthracis* и одновременно были вакцинированы для достижения защитного уровня антитела антитоксина (Bell DM, Kozarsky PE, Stephens DS. Clinical issues in the prophylaxis, diagnosis, and treatment of anthrax. Emerg Infect Dis. 2002,8:222–5, Hendricks KA, Wright ME, et al. Centers for disease control and prevention expert panel meetings on prevention and treatment of anthrax in adults. Emerg Infect Dis. 2014,20). Прием антибиотиков прекращают, когда проходит достаточно времени для достижения защитного титра. Очевидно, что в случае чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения рекомендация CDC, требующая многократных доз болезненной реактогенной иммуногенной композиции (например, вакцины) и 60-ти дневного курса антибиотиков, представляет собой значительные проблемы с логистикой и информированием общественности. Иммуногенная композиция второго поколения (например, вакцина) должна иметь улучшенную переносимость, более быстрое наступление защиты и более простую схему введения, чтобы уменьшить нагрузку на ресурсы здравоохранения, которые, вероятно, будут пользоваться повышенным спросом в случае воздействия биологического токсина на большую популяцию.

[0009] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к иллюстративной иммуногенной композиции второго поколения против биологического токсина (например, вакцины), разработанной заявителем под названием NasoShield (ранее известна как AdVAV), векторной иммуногенной композиции против вируса сибирской язвы (например, вакцины), разработанной для интраназального введения и предназначенной для обеспечения быстрой, стабильной защиты после однократного интраназального введения. Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к иллюстративной иммуногенной композиции против биологического вируса гриппа (например, иммуногенной композиции (например, вакцине)), упоминаемой в настоящем документе как NasoVAX, и новому способу ее введения. Устранение потребности в бустерной иммуногенной композиции (например, вакцине) и простое интраназальное введение иммуногенной композиции (например, вакцины) стали значительным улучшением, однако эффективность варьировалась. Возникла необходимость определить, почему эффективность иммуногенной композиции (например, вакцины) может проявлять такую изменчивость, и создать иммуногенную композицию (например, иммуногенную композицию (например, вакцину)), которая защищает от переносимых по воздуху инфекционных агентов и биотоксинов, таких как

легочная форма сибирской язвы, которая будет вызвать защитный иммунный ответ после введения. Авторы настоящего изобретения в настоящем документе раскрывают способ введения такой иммуногенной композиции или состава (например, иммуногенной композиции (например, вакцины)), посредством которого эффективность такой иммуногенной композиции (например, вакцины) значительно повышается.

Сущность настоящего изобретения

[0010] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам вызова иммунного ответа, такого как защитный иммунный ответ, против патогена посредством интраназального введения. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном является респираторный патоген.

[0011] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей респираторный антиген, субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции (например, вакцины), где субъект в ходе введения находится в сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек.

[0012] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего, где субъект в ходе введения находится в сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек. Согласно определенным вариантам осуществления гетерологичный антиген происходит из вируса гриппа, а способ предназначен для лечения

и/или профилактики инфекции, вызванной вирусом гриппа, и согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления предотвращает клиническое ухудшение у пациента, страдающего гриппом. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген происходит из вируса коронавируса, а способ предназначен для лечения и/или профилактики инфекции, вызванной коронавирусом, таким как SARS-CoV-2 (возбудитель COVID-19), и согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления предотвращает клиническое ухудшение у пациента, страдающего COVID-19.

[0013] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который не содержит и не экспрессирует гетерологичный антиген, где субъект в ходе введения находится в сидячем, полулежащем, лежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно вариантам осуществления защитный иммунный ответ возникает против респираторных патогенов, включая вирус гриппа, легочную форму сибирской язвы или коронавирус.

[0014] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу вызова у пациента защитного иммунного ответа, предусматривающему интраназальное введение пациенту эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежащем или лежащем положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и при введении пациента инструктируют сохранять модифицированное сидячее, лежащее или полулежащее положение в течение 30 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента.

[0015] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу вакцинации пациента против вирусной инфекции, предусматривающему интраназальное введение пациенту эффективного количества

терапевтической дозы иммуногенной композиции, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и при введении пациента инструктируют сохранять модифицированное сидячее, лежачее или полулежачее положение в течение 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут или 30 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента.

[0016] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения вирусной инфекции у пациента, предусматривающему интраназальное введение пациенту эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и при введении пациента инструктируют сохранять модифицированное сидячее, лежачее или полулежачее положение в течение 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут или 30 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента.

[0017] Специалистам в области техники настоящего изобретения на основании настоящего раскрытия понятно, что другие варианты осуществления также предполагаются.

Краткое описание чертежей

[0018] Следующие чертежи, которые включены в настоящий документ и составляют часть настоящего описания, иллюстрируют один или более вариантов осуществления настоящего изобретения и вместе с подробным описанием и примерами служат для пояснения принципов и реализации настоящего изобретения.

[0019] На **фиг. 1** приведено схематическое изображение иллюстративного аденовирусного вектора, содержащего ген протективного антигена (РА) сибирской язвы, где числа относятся к числу пар оснований в последовательности Ad5 дикого типа, GenBank ID AY339865.1.

[0020] На **фиг. 2** показано отсутствие иммуногенности с помощью анализа нейтрализации токсинов (ТНА) в исследовании NasoShield фазы 1, в котором субъектам-

человеку вводили NasoShield при четырех различных концентрациях вирусных частиц (vp) по сравнению с BioThrax и плацебо. См. Пример 2.

[0021] На **фиг. 3** показаны результаты анализа нейтрализации токсинов (TNA) из доклинического исследования на кроликах в поддержку первого клинического испытания на людях согласно Примеру 2.

[0022] На **фиг. 4** показана схема исследования на кроликах для сравнения позиционного эффекта (например, стернальное положение или дорсальное положение) кролика во время введения иммуногенной композиции в отношении иммуногенности интраназального введения NasoShield.

[0023] На **фиг. 5** показаны ED_{50} TNA и NF_{50} TNA для вакцинированных кроликов, оцененные в ходе валидированного анализа TNA на день 28 после вакцинации. Стернальное положение для введения не показало иммуногенности в анализе TNA.

[0024] На **фиг. 6** показан позиционный эффект на иммуногенность, как измерено с помощью анализа нейтрализации токсинов (TNA), функционального анализа, который измеряет и количественно определяет способность сыворотки нейтрализовать фактор летальности (LT) *B. anthracis*, при интраназальном введении иммуногенной композиции.

[0025] На **фиг. 7** показан процент выживаемости кроликов, которым вводили NasoShield в дорсальном положении (например, стандартное положение кролика для интраназального введения) или в стернальном положении (клинический эквивалент положения) после заражения спорами сибирской язвы. Животные, которым вводили NasoShield в стернальном положении, продемонстрировали 0% выживаемость после заражения сибирской язвой по сравнению с выживаемостью от 54% до 79% для животных, которым вводили иммуногенную композицию в дорсальном положении.

[0026] На **фиг. 8** показаны результаты NF_{50} TNA по сравнению с выживаемостью кроликов в каждой из групп с различными дозами.

[0027] На **фиг. 9** показана схема исследования на кроликах для сравнения позиционного эффекта (например, стернальное положение или дорсальное положение) кролика в ходе введения иммуногенной композиции в отношении иммуногенности интраназального введения NasoVAX.

[0028] На **фиг. 10** показан анализ HAI геометрического среднего титра вакцинированных кроликов, оцененный на дни 0, 14 и 28 после вакцинации.

[0029] На **фиг. 11** показан анализ HAI геометрического среднего титра вакцинированных кроликов, оцененный на дни 0 и 28 после вакцинации.

[0030] На **фиг. 12** показано отношение геометрических средних (GMR) анализа HAI для вакцинированных кроликов, оцененное на дни 14 и 28 после вакцинации.

[0031] На **фиг. 13** показана средняя оценка анализа НАИ для вакцинированных кроликов, оцененная на дни 0 и 28 после вакцинации.

Подробное описание настоящего изобретения

[0032] Введение

[0033] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для создания сильного иммунного ответа посредством интраназального введения иммуногенной композиции (например, вакцины)/терапевтической композиции субъекту-млекопитающему. Согласно некоторым вариантам осуществления определенные положения субъекта в ходе введения иммуногенных средств, такие, когда ноздри направлены вверх, при сидячем, полулежащем и/или лежащем положении, коррелируют с созданием сильного иммунного ответа как у людей, так и у животных. Неожиданно было обнаружено, что положение введения (например, положение головы/ноздрей в ходе интраназального введения) является критически значимым параметром для создания иммуногенного ответа для интраназально вводимых иммуногенных композиций (например, вакцин) и потенциально других терапевтических средств. См. Примеры 3-4. Авторы настоящего изобретения предположили, что наклон головы (ноздри направлены вверх) может позволить терапевтическому средству/иммуногенной композиции (например, вакцине) получить доступ и/или локализоваться в определенных областях носовых ходов, придаточных пазух носа и прилегающих тканях/органах, что может иметь решающее значение для вызова иммунного ответа при трансмукозальном введении. Области, достигаемые посредством интраназального введения в стернальном положении (у животных) и в сидячем положении с направленными вниз ноздрями (у людей), могут быть разными и/или неоптимальными для создания сильного иммунного ответа.

[0034] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку субъекту-млекопитающему терапевтической дозы иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей антиген патогена и/или один или более гетерологичных антигенов, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции (например, вакцины), где субъект в ходе введения находится в лежащем, плулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх или находятся выше головы субъекта, и посредством чего введенная терапевтическая доза вызывает защитный иммунный ответ. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку субъекту-млекопитающему терапевтической дозы

иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора субъекту-млекопитающему, где иммуногенная композиция на основе нереплицирующегося вирусного вектора содержит аденовирусный вектор, дефектный по репликации, содержащий и экспрессирующий или не содержащий и не экспрессирующий кодирующую последовательность гетерологичного антигена, кодон-оптимизированную для субъекта-млекопитающего, и где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции (например, вакцины), где субъект в ходе введения находится в лежачем, плулежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх или находятся выше головы субъекта, и посредством чего введенная терапевтическая доза вызывает защитный иммунный ответ. Согласно определенным вариантам осуществления защитный иммунный ответ направлен против респираторного патогена. Согласно определенным вариантам осуществления защитный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ, который может быть вызван в течение 24 часов или от 1 до нескольких дней и может длиться до 14 дней или дольше. Согласно определенным вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек.

[0035] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к интраназальной иммуногенной композиции на основе аденовирусного вектора (например, Ad5-векторной) (например, вакцине), получаемой в клеточной культуре (NasoShield), см. патент США № 9968667, содержание которого включено посредством ссылки во всей своей полноте. Аденовирус представляет собой респираторный вирус природного происхождения, который часто используется в качестве вектора для введения генетического материала в клетки. Путем включения гена протективного антигена (РА) *B. anthracis* в дефектный по репликации (RD) аденовирус (Ad-РА) и введения Ad-РА в нос (интраназальный путь введения) аденовирусный вектор может трансдуцировать ген РА в клетки подслизистой оболочки носа, что приводит к временной экспрессии кодируемого белка РА. NasoShield обычно вводят интраназально, но настоящее раскрытие демонстрирует, что иммуногенная композиция (например, вакцина) неожиданно вызвала сильный иммуногенный ответ при введении, когда ноздри были направлены вверх или находились над головой (т.е. модифицированное сидячее положение, положение лежа на спине или лежачее положение). Вектор NasoShield содержит генетическую вставку, такую как трансген, кодирующий ген РА₈₃ (протективный антиген – форма 83 кДа) из *B. anthracis* (или любой другой представляющий интерес трансген). В рекомбинантном векторе Ad5 отсутствует область E1 вирусного генома, что делает вирус дефектным по репликации (RD) и неспособным продуцировать инфекционные вирусные частицы при попадании в клетку-

хозяина. Дополнительная делеция нуклеотидов в области E3 вектора удаляет гены, которые участвуют в уклонении от иммунного ответа хозяина и необязательны для репликации вируса. Экспрессионную кассету, состоящую из энхансера/промотора транскрипции цитомегаловируса для управления экспрессией гена PA₈₃ (или другого специфического трансгена) и сигнала полиаденилирования Simian Virus 40, вставляли в место последовательностей гена E1. На **фиг. 1** приведено схематическое изображение вектора RD-Ad5 и указаны те последовательности исходного генома аденовируса, которые сохраняются в векторе. См. Примеры 1, 3 и 5.

[0036] Как очевидно специалисту в данной области техники и согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения измерение ответа нейтрализующего токсина антитела (TNA) может использоваться как «суррогат защиты». Например, в опубликованных исследованиях титр антител NF₅₀ TNA (токсин -нейтрализующих антител к PA), равный 0,56, измеренный в кроличьей сыворотке после вакцинации, был связан с 70%-ной вероятностью выживания при летальном заражении спорами *Bacillus anthracis* (Ionin et al. Evaluation of Immunogenicity and Efficacy of Anthrax Vaccine Adsorbed for Postexposure Prophylaxis, Clin. and Vaccine Immunol., July 2013:20(7), p. 1016-1026). «Суррогат защиты» означает иммунный маркер, который может заменить клиническую конечную точку и, таким образом, может быть использован для надежного прогнозирования эффективности иммуногенной композиции (например, вакцины) (Plotkin S.; Correlates of Protection Induced by Vaccination; Clin Immunogenic composition (e.g., vaccine) Immunol. 2010 July; 17(7): 1055-1065).

[0037] Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к интраназальной иммуногенной композиции против вируса гриппа («flu») на основе аденовирусного вектора (например, Ad5-векторная) (например, вакцине), полученной в клеточной культуре (NasoVAX). Аденовирус представляет собой встречающийся в природе респираторный вирус, который часто используется в качестве вектора для введения генетического материала в клетки. Путем включения гена гемагглютинина гриппа (HA) в дефектный по репликации (RD) аденовирус (Ad-HA) и введения Ad-HA в нос (интраназальный путь введения) аденовирусный вектор может трансдуцировать ген HA в клетки подслизистой оболочки носа, что приводит к временной экспрессии кодируемого белка HA. Согласно некоторым вариантам осуществления дефектный по репликации аденовирусный вектор, содержащий и экспрессирующий антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека (например, NasoVAX), может быть получен согласно методике, подробно описанной в Lui J. et al. (A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system;

Nat. Protoc. (2007) 2(5):1236-47). NasoVAX, как применяется в раскрытых в настоящем документе Примерах, представляет собой дефектный по репликации (RD)-Ad5 с делецией E1/E3, который экспрессирует представляющий интерес белок (например, HA вируса гриппа типа А или В) в респираторных эпителиальных клетках. Таким образом, у NasoVAX отсутствует область E1 вирусного генома (нуклеотиды 343 - 3511), что приводит к дефектному по репликации (RD) вирусу, не способному продуцировать инфекционные вирусные частицы при попадании в клетку-хозяин. NasoVAX включает дополнительную делецию нуклеотидов в области E3 вектора, которая удаляет гены, участвующие в уклонении от иммунного ответа хозяина и необязательные для репликации вируса. NasoVAX также включает экспрессионную кассету, состоящую из энхансера/промотора транскрипции цитомегаловируса для управления экспрессией гена HA, биоинженерного гена HA и сигнала полиаденилирования Simian Virus 40, вставленного в место последовательностей гена E1. На **фиг. 1** приведено схематическое изображение вектора RD-Ad5 и указаны те последовательности исходного генома аденовируса, которые сохраняются в векторе NasoVAX. Согласно определенным вариантам осуществления вектор NasoVAX содержит генную вставку, кодирующую антиген поверхностный белок гемагглютинин (HA) из A/California/04/2009(H1N1)-подобного штамма вируса гриппа (AdcoCA09.HA). NasoVAX может быть получен путем размножения этого вектора RD-Ad5 в клетках PER.C6, допускающих репликацию, с последующей очисткой вируса из собранных инфицированных клеток, а конечный продукт может включать вспомогательные вещества, выбранные из Tris HCl (pH 7,4), гистидина, сахарозы, хлорида натрия, хлорида магния, полисорбата 80, этилендиаминтетрауксусной кислоты и этанола. NasoVAX может поставляться в одноразовых стеклянных флаконах, каждый из которых содержит номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), согласно некоторым вариантам осуществления в виде 2×10^{10} vп/мл в буфере A195. Согласно предпочтительным вариантам осуществления NasoVAX может быть доставлен интраназально, в настоящем раскрытии показано, что иммуногенная композиция (например, вакцина) неожиданно вызывает сильный иммуногенный ответ при введении таким образом, когда ноздри направлены вверх или находятся над головой (т.е. в модифицированном сидячем, лежащем или полулежащем положении (например, дорсальное положение)). См., например, примеры 4 и 6.

[0038] Как понятно специалисту в данной области техники, измерение антител посредством анализа ингибирования гемагглютинации (HAI) используют в качестве суррогата защиты, где титр антител HAI ≥ 40 , измеренный в сыворотке после вакцинации, демонстрирует индуцированную серологическую защиту введенной иммуногенной

композицией против вируса гриппа (например, вакцины) (Trombetta CM. et al.; Overview of Serological Techniques for influenza immunogenic composition (e.g., vaccine) Evaluation: Past, Present and Future Immunogenic composition (e.g., vaccine) (Basel) (2014) Dec. 2(4): 707-734). Как упоминалось выше, «суррогат защиты» относится к иммунному маркеру, который может заменить клиническую конечную точку и, таким образом, может быть использован для надежного прогнозирования эффективности иммуногенной композиции (например, вакцины). В случае иммуногенной композиции против вируса гриппа (например, вакцины) антитела, измеренные в анализе HAI, являются суррогатом защиты, при этом анализ HAI основан на способности антител, если они присутствуют в сыворотке, предотвращать агглютинацию между эритроцитами и вирусным гемагглютинином. Общеизвестно, что субъекты с титром антител в анализе HAI ≥ 40 защищены от представленных подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В. Другими словами, титр антител в анализе HAI, равный 40 (или выше) обычно считается защитным пороговым уровнем, выше которого существует 50% или более снижение возможности заражения инфекцией гриппа. Титр анализа HAI, равный или превышающий 40, используется в качестве иммунологического коррелята защиты и считается лучшим доступным в настоящее время параметром для прогнозирования защиты от естественной инфекции в соответствии с рекомендациями FDA для вакцин против пандемического гриппа (Noah D.L., Hill H., Hines D., White E.L., Wolff M.C. Qualification of the hemagglutination inhibition assay in support of pandemic influenza vaccine licensure. Clin. Immunogenic composition (e.g., vaccine) Immunol. 2009;16:558–566). Согласно некоторым вариантам осуществления использование анализа HAI для измерения иммунного ответа после введения иммуногенной композиции (например, вакцины, NasoVAX) описано в примере 4, а результаты представлены на **фиг. 10-13**. Другие варианты анализа HAI и его применение также рассматриваются в настоящем документе, как это будет понятно специалистам в данной области техники.

[0039] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к интраназальной иммуногенной композиции на основе аденовирусного вектора (например, Ad5-векторной) против COVID-19 (например, вакцине), производимой в клеточной культуре. Согласно определенным вариантам осуществления гетерологичный антиген представляет собой антиген вируса коронавируса (например, шиповидный белок или его фрагмент), а способ предназначен для лечения и/или профилактики инфекции коронавируса, такой как SARS-CoV-2 (возбудитель заболевания COVID-19) и согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления предотвращает клиническое ухудшение у пациента с COVID-19. Посредством включения гена SARS-Cov-2 (например, шиповидный белок) в дефектный по репликации (RD) аденовирус (AdCOVID) и введения

AdCOVID в нос (интраназальный путь введения), аденовирусный вектор может трансдуцировать ген белкового антигена в клетки подслизистой оболочки носа, что приводит к временной экспрессии кодируемого антигенного белка или его фрагмента. Согласно определенным вариантам осуществления дефектный по репликации аденовирус (RD) не включает гетерологичный антиген (например, трансген другого респираторного патогена) (также называемый в настоящем документе «AdE»), но при интраназальном введении субъекту в положении с ноздрями, направленными вверх или находящимися выше головы, вызывает защитный иммунный ответ против респираторных патогенов, включая SARS-Cov-2. Дефектный по репликации аденовирусный вектор связывается со своим рецептором на клетках подслизистой оболочки носа, вызывая врожденный иммунный ответ, который может защищать человека от респираторных патогенов. Согласно вариантам осуществления защитный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ, который вызывается в течение приблизительно 24 часов или в течение 1-2 дней, и может длиться в течение по меньшей мере приблизительно 14 дней или по меньшей мере приблизительно 21 дней. Это раскрытие, по меньшей мере частично, относится к раскрытой иммуногенной композиции (например, вакцине), которая неожиданно индуцировала сильный иммуногенный ответ при введении таким образом, когда ноздри были направлены вверх или находились выше головы (т.е., модифицированное лежачее, полулежачее (дорсальное) или лежачее положение). См. Пример 6.

[0040] Другие варианты осуществления также предполагаются, как будет понятно специалистам в данной области техники из настоящего раскрытия.

[0041] *Определения*

[0042] В контексте настоящего изобретения форма единственного числа, как обычно используется в патентных документах, включает один или более чем один, независимо от любых других случаев или применений «по меньшей мере один» или «один или более».

[0043] В контексте настоящего изобретения термин «или» используется для ссылки не исключительно на или, так что «А или В» включает «А, но не В», «В, но не А» и «А и В», если не указано иное.

[0044] В контексте настоящего изобретения термин «приблизительно» используется для обозначения количества, которое приблизительно, около, почти или почти равно указанному количеству или равно указанному количеству, например, указанному количеству плюс/минус приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%.

[0045] Композиции, составы и способы согласно настоящему изобретению могут содержать, состоять по существу из или состоять из компонентов и ингредиентов согласно настоящему изобретению, а также других ингредиентов, описанных в настоящем документе. В контексте настоящего изобретения термин «состоящие по существу из» означает, что композиции, составы и способы могут включать дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты, но только в том случае, если дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты не изменяют существенно основные и новые признаки заявленных композиций, составов и способов.

[0046] Также следует отметить, что в контексте описания настоящего изобретения и в приложенной формулы изобретения термин «разработанный» описывает систему, устройство или другую структуру, которая разработана или сконфигурирована для выполнения конкретной задачи или принятия конкретной конфигурации. Термин «разработанный» может использоваться взаимозаменяемо с другими подобными фразами, такими как сформированный и разработанный, выполненный и сформированный, адаптированный и разработанный, адаптированный, выполненный, изготовленный и сформированный и тому подобное.

[0047] В контексте настоящего изобретения термин «адьювант» относится к отдельному/второму веществу, которое усиливает иммунный ответ организма на антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа согласно настоящему изобретению представляет собой неадьювантную иммуногенную композицию (например, вакцину).

[0048] Под «введением» подразумевается введение иммуногенной композиции (например, вакцины) согласно настоящему изобретению субъекту, это может также относиться к действию предоставления композиции согласно настоящему изобретению субъекту (например, путем назначения).

[0049] Термин «положение дозирования», как раскрыто в настоящем документе, относится к положению субъекта в ходе интраназального введения иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению и, необязательно, в течение периода выдержки после введения дозы. Эти положения дозирования включают: а) обычное сидячее положение с ноздрями, направленными вниз, положение может сохраняться, когда голова субъекта направлена прямо вперед, а глаза сфокусированы прямо перед собой на объекте на уровне глаз, или 2) модифицированное сидячее, полулежачее, лежачее или другое положение, при котором ноздри субъекта-млекопитающего наклонены вверх. Модифицированное сидячее положение означает положение дозирования, при котором субъект сидит с поднятыми над головой ноздрями. Это достигается, например, при

запрокинутой назад голове и приподнятом подбородке настолько, насколько это возможно, при взгляде, сфокусированном на потолке (или небе в случае улицы). Лежачее положение означает положение, при котором субъект лежит на спине (без подушки), голова обращена вперед, а глаза сфокусированы прямо на потолке (или небе в случае улицы). Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению вводят посредством интраназального устройства (например, распылителя), слегка наклоненного внутрь к перегородке носа, при этом устройство (например, цилиндр шприца) находится в лицевой плоскости.

[0050] Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество», как раскрыто в настоящем документе, относится к вводимому количеству соединения, которое вызывает врожденный, мукозальный, гумаральный и/или клеточно-опосредованный иммунный ответ, где иммунный ответ означает, как в общем известно специалисту в данной области техники, иммуногенный, терапевтический и/или защитный (например, в качестве вакцины). Термин также относится к количеству композиций согласно настоящему изобретению или их пути введения, как раскрыто в настоящем документе, которое облегчает или предотвращает в некоторой степени один или более симптомов состояния, подлежащего лечению. Что касается состояний/заболеваний, которые можно лечить непосредственно композицией согласно настоящему изобретению, терапевтически эффективное количество относится к такому количеству, которое оказывает эффект предотвращения возникновения состояния/заболевания у млекопитающего, которое может быть предрасположено к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет симптомов состояния/заболевания (профилактическое лечение), облегчения симптомов состояния/заболевания, уменьшения степени тяжести состояния/заболевания, стабилизации (например, отсутствие ухудшения) состояния/заболевания, предотвращения распространения состояния/заболевания, отсрочки или замедления прогрессирования состояния/заболевания, улучшения или облегчения состояния/болезненного состояния и их комбинаций (например, в качестве вакцины). Термин «эффективное количество» относится к такому количеству вводимого соединения, которое вызывает реакцию, отличную от реакции, которая произошла бы без соединения.

[0051] Термин «терапевтическая доза», как раскрыто в настоящем документе, относится к количеству иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению, разработанной и/или составленной для интраназального введения, которое обеспечивает терапевтически эффективное количество. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтическая доза присутствует в виде разделенной дозы, что означает,

что первую порцию вводят в одну ноздрю, а вторую порцию вводят во вторую ноздрю, и в комбинации они обеспечивают терапевтическую дозу.

[0052] В контексте настоящего изобретения термин «аденовирус человека» предназначен для охвата всех аденовирусов человека семейства *Adenoviridae*, которые включают представителей родов *Mastadenovirus*. На сегодняшний день идентифицировано более 51 серологических типа аденовирусов человека (см., например, Fields et al., *Virology* 2, Ch. 67 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers)). Аденовирус может относиться к серологическому типу А, В, С, D, Е или F. Аденовирус человека может иметь серологический тип 1 (Ad 1), серологический тип 2 (Ad2), серологический тип 3 (Ad3), серологический тип 4 (Ad4), серологический тип 5 (Ad5), серологический тип 6 (Ad6), серологический тип 7 (Ad7), серологический тип 8 (Ad8), серологический тип 9 (Ad9), серологический тип 10 (Ad10), серологический тип 11 (Ad11), серологический тип 12 (Ad12), серологический тип 13 (Ad13), серологический тип 14 (Ad14), серологический тип 15 (Ad15), серологический тип 16 (Ad16), серологический тип 17 (Ad17), серологический тип 18 (Ad18), серологический тип 19 (Ad19), серологический тип 19a (Ad19a), серологический тип 19p (Ad19p), серологический тип 20 (Ad20), серологический тип 21 (Ad21), серологический тип 22 (Ad22), серологический тип 23 (Ad23), серологический тип 24 (Ad24), серологический тип 25 (Ad25), серологический тип 26 (Ad26), серологический тип 27 (Ad27), серологический тип 28 (Ad28), серологический тип 29 (Ad29), серологический тип 30 (Ad30), серологический тип 31 (Ad31), серологический тип 32 (Ad32), серологический тип 33 (Ad33), серологический тип 34 (Ad34), серологический тип 35 (Ad35), серологический тип 36 (Ad36), серологический тип 37 (Ad37), серологический тип 38 (Ad38), серологический тип 39 (Ad39), серологический тип 40 (Ad40), серологический тип 41 (Ad41), серологический тип 42 (Ad42), серологический тип 43 (Ad43), серологический тип 44 (Ad44), серологический тип 45 (Ad45), серологический тип 46 (Ad46), серологический тип 47 (Ad47), серологический тип 48 (Ad48), серологический тип 49 (Ad49), серологический тип 50 (Ad50), серологический тип 51 (Ad51), или их комбинации, но без ограничения этими примерами. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирус относится к серологическому типу 5 (Ad5).

[0053] В контексте настоящего изобретения «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения у субъекта-человека и не отменяет биологическую активность и свойства вводимой иммуногенной композиции (например, вакцины).

[0054] В контексте настоящего изобретения термин «сероконверсия» определяется как 4-кратное или большее увеличение титров нейтрализующих антител в сыворотке после

вакцинации (например, введения иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению). В контексте вируса гриппа термин «сероконверсия» представляет собой процентную долю лиц, вакцинированных (которым введена иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакциной)), у которых после вакцинации наблюдается не менее 4-кратное увеличение сывороточных титров ингибирования гемагглютинаина (HI). В контексте настоящего изобретения термин «коэффициент конверсии» определяется как кратное увеличение сывороточных средних геометрических титров (GMT) HI после вакцинации.

[0055] В контексте настоящего изобретения термин «серологически защищенный» означает субъекта после вакцинации, который защищен от инфекции посредством образования сывороточных нейтрализующих антител. В популяции это обозначается как процент (%) серологически защищенных индивидуумов (например, 50%). В контексте вируса гриппа термин «серологическая защита» относится к титру антител HI 40 или выше, измеренному в сыворотке человека после вакцинации. Термин «уровень защиты», как раскрыто в настоящем изобретении в контексте вируса гриппа, определяется как процент индивидуумов, вакцинированных с титром HI в сыворотке, равным или превышающим 1:40 после вакцинации, и обычно считается показателем защиты. Согласно вариантам осуществления иммуногенные композиции и способы применения согласно настоящему изобретению обеспечивают серологическую защиту субъекта-млекопитающего, такого как человек, от инфекции SARS-CoV-2. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенные композиции и способы применения согласно настоящему изобретению обеспечивают серологическую защиту субъекта-млекопитающего, такого как человек, от инфекции *B. anthracis*.

[0056] Термины «лечить», «лечение» и «обработка» представляют собой подход к получению благоприятных или желаемых клинических результатов. В частности, благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (например, отсутствие ухудшения) заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, существенное предотвращение распространения заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), либо обнаруживаемую, либо не обнаруживаемую. Кроме того, термины «лечить», «лечение» и «обработка» также могут означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится, и/или могут быть терапевтическими с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного воздействия, связанного с заболеванием. В контексте настоящего изобретения термины

«лечить профилактически» или «профилактическое лечение» относятся к полному, существенному или частичному предотвращению заболевания/состояния или его одного или более симптомов у хозяина. Подобным образом, «отсрочка начала состояния» также может быть включена в «профилактическое лечение» и относится к эффекту увеличения времени до фактического начала состояния у пациента, который предрасположен к этому состоянию.

[0057] В контексте настоящего изобретения «иммуногенная композиция» относится к композиции, которая при введении вызывает иммунный ответ (например, врожденный, гуморальный, мукозальный и/или клеточно-опосредованный). В случае гуморального, мукозального и/или клеточно-опосредованного иммунного ответа иммуногенная композиция вызывает иммунный ответ против антигена и, соответственно, патогена, из которого он получен, вводимого хозяину. В случае врожденного иммунного ответа, вызванного интраназально введенным аденовирусным вектором, иммуногенная композиция вызывает иммунный ответ против респираторных патогенов, который может быть защитным в течение периода от приблизительно 24 часов до по меньшей мере 14 дней. В контексте настоящего изобретения термин «вакцина» относится к иммуногенной композиции, которая при введении вызывает защитный иммунный ответ против инфекционного агента. «Защитный иммунный ответ» представляет собой ответ, который защищает субъекта-млекопитающего (например, пациента) от инфекции и/или облегчает симптомы инфекции, вызванной патогеном, подверженным или иным образом чувствительным к иммунному ответу против по меньшей мере одного компонента иммуногенной композиции, как правило, по меньшей мере одного ее антигена (например, гетерологичный антиген). Согласно определенным вариантам осуществления, как раскрыто в настоящем документе, защитный иммунный ответ относится к врожденному иммунному ответу на все противовирусные препараты, который защищает субъекта-млекопитающего (например, пациента) от инфекции и/или облегчает симптомы инфекции. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) может содержать один или более вирусных векторов, содержащих или не содержащих гетерологичный антиген и/или экспрессирующих или не экспрессирующих его, наряду с другими компонентами иммуногенной композиции (например, вакцины), подходящими для введения хозяину-млекопитающему, включая, например, один или более адъювантов, соединений с медленным высвобождением, растворителей, буферов и т.д. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция и/или вакцина могут содержать белок, и/или углевод, и/или липид, и/или другой антиген, включая без ограничения один или более убитых антигенов (например, убитый или полностью

неактивный вирус) или живой аттенуированный антиген (например, аттенуированный вирус). Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция (композиции) и/или вакцина (вакцины) улучшают иммунные ответы на любой антиген независимо от источника антигена или его функции.

[0058] Как упоминается в настоящем документе, «вектор» несет генетический код или его часть для антигена, однако, он не является самим антигеном. Согласно иллюстративному аспекту вектор может включать вирусный вектор или бактериальный вектор. В контексте настоящего изобретения «антиген» означает вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у субъекта, включая людей и/или животных. Антиген может включать целый организм, убитый, ослабленный или живой, субъединицу или часть организма, рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами, часть или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунный ответ при представлении животному-хозяину, полипептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. Согласно различным аспектам антиген представляет собой вирус, бактерию, субъединицу организма, аутоантиген или раковый антиген. В контексте вирусного вектора экспрессируемый гетерологичный антиген представляет собой антиген, полученный из патогена, отличного от вируса, используемого для вирусного вектора.

[0059] В контексте настоящего изобретения термин «ED₅₀» относится к 50% эффективному разведению, которое является обратным значением разведения образца сыворотки, которое приводит к 50% нейтрализации токсина (например, летального токсина сибирской язвы), и определяется как обратное значение разбавления, соответствующее точке перегиба (параметр 'c') 4-параметрической логистической кривой.

[0060] В контексте настоящего изобретения термин «NF₅₀» относится к 50% фактору нейтрализации, который представляет собой отношение ED₅₀ тестируемого образца и ED₅₀ эталонной сыворотки. NF₅₀ служит относительной мерой нейтрализации токсина и в меньшей степени зависит от вариабельности анализа по дням.

[0061] В контексте настоящего изобретения TNA относится к анализу нейтрализации токсина, при этом анализ TNA предназначен для измерения и количественного определения функциональной способности сыворотки нейтрализовать активность LT *B. anthracis* с использованием анализа цитотоксичности *in vitro*. Анализ колориметрически определяет жизнеспособность клеток с использованием соли тетразолия, бромида 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в качестве репортера или сигнальной системы. Опосредованная сывороткой нейтрализация LT сибирской язвы проявляется подавлением цитотоксичности и, следовательно, сохранением жизнеспособности клеток.

[0062] Иммуногенные композиции и вакцины

[0063] Настоящее изобретение относится к фармацевтически приемлемым композициям (которые также могут упоминаться как составы), подходящим и/или разработанным для интраназального введения субъекту-млекопитающему, и которые разработаны для вызова иммунного ответа против антигена (например, иммуногена), или лечения вызванной им инфекции, и необязательно вызова защитного иммунного ответа (т.е., в качестве вакцины). Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтический состав представляет собой иммуногенную композицию, которая при введении вызывает иммунный ответ против антигена у субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтический состав представляет собой иммуногенную композицию, которая при введении вызывает противовирусный иммунный ответ, который лечит и/или защищает от респираторного патогена и/или облегчает симптомы респираторной инфекции у субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтический состав представляет собой вакцину или терапевтическую композицию, разработанную для вызова защитного иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, который защищает от чужеродных инфекционных агентов, таких как бактериальные, вирусные или грибковые патогены, или согласно определенным вариантам осуществления вызывает или стимулирует защитный ответ против аберрантного роста клеток (например, рака).

[0064] Согласно определенным вариантам осуществления композиция согласно настоящему изобретению представляет собой иммуногенную композицию (например, вакцину), которая согласно некоторым вариантам осуществления может содержать вектор (например, один или более векторов, экспрессирующих патогенный антиген, как например, иммуногенная композиция на основе аденовирусного вектора (Ad) (например, вакцина)), живой аттенуированный патоген (например, вирус гриппа, который не приводит к продуктивному заражению), убитый или очищенный антиген (например, антиген вируса гриппа без активного (т.е. инфицирующего) вируса, один или более иммуногенных антигенов вызывают иммунный ответ *in vivo* без вызова инфекции) или живой вирус (например, четырехвалентная иммуногенная композиция против вируса гриппа FluMist® (например, вакцина), комбинация четырех вирусов гриппа, которые не реплицируются эффективно при нормальной температуре тела (например, адаптированные к холоду, живые аттенуированные или чувствительные к температуре штаммы)). Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) может содержать вирусный вектор, который не экспрессирует гетерологичный антиген, и согласно иллюстративным вариантам осуществления вирусный вектор может быть

дефектным по репликации. См. патент США № 9605275 (включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), согласно которому пустой аденовирусный вектор (AdE) быстро вызывает защитный иммунный ответ против респираторных патогенов. Согласно вариантам осуществления респираторные патогены выбирают из инфекций гриппа и сибирской язвы. Согласно вариантам осуществления применение AdE в способах согласно настоящему изобретению вызывает защитный иммунный ответ против коронавируса, включая SARS-Cov-2.

[0065] Более того, композиции согласно настоящему изобретению разработаны для интраназального введения (например, жидкость, спрей, аэрозоль), но без ограничения, с вызовом иммунного ответа (например, защитного иммунного ответа) против респираторного патогена. Другими словами, интраназальное введение обеспечивает путь введения для индукции системного и/или защитного ответа (например, в качестве вакцины) для любого патогена.

[0066] Согласно определенным вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является субъект-человек. Согласно некоторым вариантам осуществления составы согласно настоящему изобретению содержат эффективное количество по меньшей мере 10^7 (по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 , по меньшей мере 10^{10} или по меньшей мере 10^{11}) вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген патогена, причем ДНК, кодирующая антиген, была кодон-оптимизирована для субъекта-человека, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно иллюстративным вариантам осуществления составом является фармацевтический состав (например, вакцина) иммуногенной композиции против сибирской язвы. Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления составом является фармацевтический состав (например, вакцина) иммуногенной композиции против вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления составом является фармацевтический состав (например, вакцина) иммуногенной композиции против коронавируса. Согласно определенным вариантам осуществления составом является фармацевтический состав (например, вакцина) иммуногенной композиции против респираторного патогена. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор присутствует в буфере для состава, содержащем трис-HCl (pH 7,4), гистидин, сахарозу, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусную кислоту и этанол.

[0067] Согласно иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу иммуногенной композиции (например, вакцины) против сибирской язвы, подходящему для интраназального введения

субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует РА антиген *B. anthracis*, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0068] Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу иммуногенной композиции (например, вакцины) против вируса гриппа, подходящему для интраназального введения субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) или согласно определенным вариантам осуществления приблизительно 10^{11} vp, которое согласно некоторым вариантам осуществления может быть разделено для двух ноздрей, обеспечивая разделенную дозу (например, 5×10^{10} vp на ноздрю), аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа (HA), кодон-оптимизированный для субъекта-человека, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0069] Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор, дефектный по репликации, согласно настоящему изобретению, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа (HA), кодон-оптимизированный для субъекта-человека, может быть объединен с другими антигенами вируса гриппа (например, антигенами, экспрессируемыми вирусным вектором) с образованием мультивалентного фармацевтического состава против вируса гриппа. Другие компоненты могут быть включены для вызова гуморального ответа с антителами к эпитопу, отличному от эпитопа, представленного в данном аденовирусном векторе, содержащем антиген гемагглютинин вируса гриппа. Согласно другим вариантам осуществления другой (другие) компонент (компоненты) может (могут) быть включен (включены) для вызова другого звена иммунной системы, такого как клеточно-опосредованный или мукозальный иммунный ответ на антиген вируса гриппа.

[0070] Согласно иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к моновалентному фармацевтическому составу против вируса гриппа, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) или согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления приблизительно 10^{11} vp, которая согласно некоторым вариантам осуществления может быть разделена для двух

ноздрей (например, 5×10^{10} vр на ноздрю), аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ, предназначенный для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку в течение по меньшей мере 1 месяца (например, 28 дней или 4 недели), по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления защитный иммунный ответ содержит комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный ответ.

[0071] Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическому составу против вируса гриппа, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vр) или согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления приблизительно 10^{11} vр, которое согласно некоторым вариантам осуществления может быть разделено для двух ноздрей (например, 5×10^{10} vр на ноздрю), аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ, предназначенный для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку с титром антител согласно $HA1 \geq 40$ в течение по меньшей мере 1 месяца (например, 28 дней или 4 недели), по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления защитный иммунный ответ содержит комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный ответ.

[0072] Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся аденовирусный вектор представляет собой аденовирус человека. Согласно альтернативным вариантам осуществления аденовирусом является аденовирус крупного рогатого скота, собачий аденовирус, аденовирус не относящихся к человеку приматов (например, шимпанзе), куриный аденовирус или аденовирус свиней или поросят. Согласно иллюстративным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирус человека.

[0073] Согласно некоторым вариантам осуществления нереплицирующиеся аденовирусные векторы особенно полезны для переноса генов в эукариотические клетки и разработки иммуногенной композиции (например, вакцины), а также на животных моделях.

[0074] Согласно некоторым вариантам осуществления любой аденовирусный вектор (Ad-вектор), известный специалисту в данной области техники, и подготовленный для введения млекопитающему, который может содержать и экспрессировать антиген вируса гриппа, может быть использован в композициях и в способах настоящего применения. Такие Ad-векторы включают любые из тех, которые раскрыты в патентах США №№ 6706693, 6716823, 6348450 или патентных публикациях США №№ 2003/0045492, 2004/0009936, 2005/0271689, 2007/0178115, 2012/0276138 (включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0075] Согласно определенным вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор может быть нереплицирующимся или дефектным по репликации, требующим для репликации дополнительной активности E1. Согласно вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор может включать E1-дефектный, E3-дефектный и/или E4-дефектный аденовирусные векторы или «выпотрошенный» аденовирусный вектор, в котором вирусные гены подвергнуты делеции. Мутация E1 повышает коэффициент надежности вектора, поскольку E1-дефектные мутанты аденовируса неспособны к репликации в непермиссивных клетках. Мутация E3 повышает иммуногенность антигена, нарушая механизм, посредством которого аденовирус подавляет молекулы МНС класса I. Мутация E4 снижает иммуногенность аденовирусного вектора посредством подавления поздней экспрессии гена, что позволяет проводить повторную ревакцинацию с использованием того же вектора. Согласно иллюстративным вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор представляет собой вектор, дефектный по E1 и E3.

[0076] Для репликации «выпотрошенного» аденовирусного вектора требуется хелперный вирус и специальная клеточная линия человека 293, экспрессирующая как E1a, так и Cpe, условие, которое не существует в естественной среде, вектор лишен вирусных генов, поэтому вектор в качестве носителя иммуногенной композиции (например, вакцины) является неиммуногенным и может быть инокулирован несколько раз для повторной вакцинации. «Выпотрошенный» аденовирусный вектор также содержит пространство размером 36 т.п.н. для размещения трансгенов, что позволяет одновременно доставлять в клетки большое количество антигенных генов. Специфические мотивы последовательности, такие как мотив RGD, могут быть вставлены в петлю H-I аденовирусного вектора для повышения его инфекционности. Рекомбинантный аденовирус

может быть сконструирован путем клонирования определенных трансгенов или фрагментов трансгенов в любой из аденовирусных векторов, таких как описанные ниже. Рекомбинантный аденовирусный вектор используют для трансдукции эпидермальных клеток позвоночных в неинвазивном режиме для использования в качестве иммунизирующего агента. Аденовирусный вектор также можно использовать для инвазивных способов введения, таких как внутривенная, внутримышечная или подкожная инъекция.

[0077] Что касается доз, способов введения, составов, адъювантов и применений рекомбинантных вирусов и продуктов их экспрессии, композиции согласно настоящему изобретению можно использовать для парентерального введения, местного введения или введения через слизистую оболочку, предпочтительно внутрикожным, подкожным, интраназальным или внутримышечным путями. Когда используется введение через слизистую оболочку, можно использовать пероральный, глазной или назальный пути. Согласно иллюстративным вариантам осуществления, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцину) вводят интраназально. Согласно иллюстративным и предпочтительным вариантам осуществления, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцину) вводят интраназально, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем, лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх или находятся выше уровня головы субъекта-млекопитающего.

[0078] Композиции (например, составы), которые содержат представляющий интерес аденовирусный вектор, могут быть получены в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалистам в области фармацевтики или ветеринарии. См. Пример 1-4. Такие составы можно вводить при дозах и способами, хорошо известными специалистам в клинической области, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, вес и способ введения. Составы можно вводить отдельно (т.е. в виде единственного активного агента (агентов) или их можно вводить совместно или последовательно с композициями, например, с «другой» иммунологической композицией, или аттенуированной, инактивированной, рекомбинантной иммуногенной композицией (например, вакциной) или терапевтическими композициями, тем самым обеспечивая поливалентные, или «коктейльные», или комбинированные композиции согласно настоящему изобретению и способы их использования. Согласно некоторым вариантам осуществления составы могут содержать сахарозу в качестве криопротектора и полисорбат-80 в качестве неионного поверхностно-активного вещества. Согласно некоторым

вариантам осуществления составы дополнительно содержат ингибиторы свободнорадикального окисления этанол и гистидин, комплексообразователь ионов металлов этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) или другие агенты с сопоставимой активностью (например, блокирующие или предотвращающие катализируемое ионами металлов свободнорадикальное окисление).

[0079] Композиции (например, составы) могут присутствовать в жидком препарате для введения через слизистую оболочку, например, в составах для перорального, назального, глазного введения и т.д., таких как суспензии, и препаратах для парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного, интраназального, внутривенного введения (например, инъекционное введение), таких как стерильные суспензии или эмульсии. В таких составах аденовирусный вектор может быть в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор, повышающие вязкость вспомогательные вещества и тому подобное. Можно использовать определенные специализированные составы для введения через слизистую оболочку, включая мукоадгезивы, вещества, способствующие проникновению через слизистую оболочку, и вещества, разрушающие слизистую оболочку. Составы также могут быть лиофилизированными или замороженными. Согласно некоторым вариантам осуществления состав хранят замороженным и оттаивают до приблизительно комнатной температуры (около 25 °C) перед введением. Составы могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для регулирования pH, адьюванты, консерванты и т.п., в зависимости от пути введения и желаемого препарата. Составы могут содержать по меньшей мере одно соединение адьюванта. Согласно иллюстративным вариантам осуществления, иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцины) не содержат адьювант.

[0080] Можно обратиться к стандартным текстам, таким как "REMGINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985, включенный в настоящий документ посредством ссылки, для получения подходящих препаратов, без излишних экспериментов.

[0081] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество (например, количество которое вызывает защитный иммунный ответ) аденовирусного вектора составляет по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген PA B. *anthracis*, кодон-оптимизированный для субъекта-человека. Специалисту в данной области техники понятно, что оптимизация кодонов улучшает экспрессию гетерологичных генов в

организме-хозяине. Антиген PA *B. anthracis* согласно настоящему изобретению, был кодон-оптимизирован для хозяина-млекопитающего, который включает субъекта-человека.

[0082] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество (например, количество, которое вызывает защитный иммунный ответ) аденовирусного вектора составляет по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), или согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления приблизительно 10^{11} vp, которое согласно некоторым вариантам осуществления может быть разделено для двух ноздрей (например, 5×10^{11} vp на ноздрю), дефектного по репликации аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген HA вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека. Антиген HA вируса гриппа согласно настоящему изобретению был кодон-оптимизирован для хозяина-млекопитающего, который включает субъекта-человека. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-человек имеет симптомы инфекции SARS-CoV-2, такой как COVID-19 и предпочтительно ранний COVID-19. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антиген представляет собой антиген вируса гриппа, антиген коронавируса, или композиция содержит AdE, и человек проявляет инфекционное заболевание начальной стадии, вызванное коронавирусной инфекцией (т.е., ранний COVID-19).

[0083] Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит эффективное количество приблизительно 10^7 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно иллюстративным вариантам осуществления, иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит эффективное количество приблизительно 10^8 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно определенным другим иллюстративным вариантам осуществления, иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит эффективное количество приблизительно 10^9 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно определенным другим иллюстративным вариантам осуществления, иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит эффективное количество приблизительно 10^{10} или более вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно определенным другим иллюстративным вариантам осуществления, иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит эффективное количество приблизительно 10^{11} или более вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно некоторым предпочтительным вариантам

осуществления при использовании интраназального введения номинальная доза может быть разделена для двух ноздрей, обеспечивая разделенную дозу (например, 5×10^{10} vp на ноздрю для общей дозы 10^{11} vp).

[0084] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество (например, количество, которое вызывает защитный иммунный ответ) аденовирусного вектора составляет по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) (например, приблизительно 10^{10} , 10^{11} или более vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, моновалентный состав против вируса гриппа) содержат эффективное количество приблизительно 10^8 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно иллюстративным вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, моновалентный состав против вируса гриппа) содержат эффективное количество приблизительно 10^9 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно определенным другим иллюстративным вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, моновалентный состав против вируса гриппа) содержат эффективное количество приблизительно 10^{10} вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению (например, моновалентный состав против вируса гриппа) содержат эффективное количество приблизительно 10^{11} вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления при использовании интраназального введения номинальная доза может быть разделена для двух ноздрей (например, 5×10^{10} vp на ноздрю для общей номинальной дозы 10^{11} vp), при введении субъекту-человеку в модифицированном сидячем, полулежащем или лежащем (дорсальном) положении (например, ноздри запрокинуты назад или находятся над головой субъекта).

[0085] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество аденовирусного вектора в иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцине) вызывает защитный иммунный ответ, когда иммуногенную композицию (например, вакцину) вводят интраназально субъекту в положении лежа, на спине, полулежа или в другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего находятся выше уровня головы субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ обеспечивает защиту против легочной формы сибирской

язвы. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ обеспечивает защиту против инфекции вируса гриппа, включая вирусы гриппа, которые вызывают сезонные или пандемические инфекции вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ обеспечивает защиту против инфекции, вызванной SARS-CoV-2, или развития симптомов COVID-19. Согласно определенным вариантам осуществления ответ на введение иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению, которая может обеспечить иммунную защиту против инфекции вируса гриппа (например, NasoVAX), может предоставляться субъекту-человеку с коронавирусной инфекцией начальной стадии (предпочтительно инфекцией SARS-CoV-2) и предупреждать клиническое ухудшение у такого субъекта-человека. Согласно вариантам осуществления введение интраназальным путем иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению, содержащей дефектный по репликации аденовирусный вектор, вызывает/индуцирует врожденный иммунный ответ, который обеспечивает защиту против респираторных патогенов, независимо от гетерологичного антигена (например, трансгена), экспрессируемого вирусным вектором, или даже когда вводят AdE.

[0086] Согласно вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит антиген вируса гриппа, антиген RSV, антиген коронавируса или его фрагмент (например, рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного (S) белка), антиген HIV, антиген SIV, антиген HPV, антиген HCV, антиген HBV, антиген CMV, антиген Staphylococcus или его фрагмент или эпитоп. Грипп может представлять собой свиной грипп, сезонный грипп, птичий грипп, включая без ограничения подтипы гриппа H1N1, гриппа H3N2, грипп H7N9 или грипп H5N1. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит аденовирусный вектор, кодирующий антиген вируса гриппа, антиген коронавируса, антиген RSV, антиген HIV, антиген SIV, антиген HPV, антиген HCV, антиген HBV, антиген CMV, антиген Staphylococcus или его фрагмент или эпитоп. Грипп может представлять собой свиной грипп, сезонный грипп, птичий грипп, грипп H1N1 или грипп H5N1, включая кодон-оптимизированные для человека варианты этих антигенов. Коронавирусом может быть SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS, коронавирус человека 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 или HKU1. Согласно вариантам осуществления антиген коронавируса может представлять собой шиповидный белок или его фрагмент (например, домен S1 или RBD домена S1). Согласно определенным вариантам осуществления антиген коронавируса может представлять собой шиповидный белок или его фрагмент (например, домен S1 или RBD домена S1) вируса SARS-CoV-2.

[0087] Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит антиген из гемагглютинина гриппа, ядерного белка вируса гриппа, М2 вируса гриппа, С-фрагмента столбнячного токсина, протективного антигена сибирской язвы, фактора летальности сибирской язвы, гликопротеина бешенства, поверхностного антигена HBV, HIV gp 120, HW gp 160, карциноэмбрионального антигена человека, SSP малярии, MSP малярии, pfg малярии, HSP микобактерии туберкулеза или их мутанта. Согласно определенным другим вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит аденовирусный вектор, кодирующий гемагглютинин вируса гриппа, ядерный белок вируса гриппа, М1 или М2 вируса гриппа, полимеразу вируса гриппа, С-фрагмент столбнячного токсина, протективный антиген сибирской язвы, фактор летальности сибирской язвы, гликопротеин бешенства, поверхностный антиген HBV, HIV gp 120, HW gp 160, карциноэмбриональный антиген человека, гликопротеин вируса Зика или его варианты, SSP малярии, MSP малярии, pfg малярии, HSP микобактерии туберкулеза или их мутанта или их мутант или вариант.

[0088] Согласно иллюстративным вариантам осуществления иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит аденовирусный вектор, кодирующий антиген PA *B. anthracis*, кодон-оптимизированный для хозяина-млекопитающего. Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит аденовирусный вектор, кодирующий НА вируса гриппа, кодон-оптимизированный для хозяина-млекопитающего. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит аденовирусный вектор, кодирующий домен RBD SARS-Cov-2 шиповидного белка, оптимизированный для хозяина-млекопитающего. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению (например, вакцина) содержит аденовирусный вектор, который не кодирует гетерологичный антиген респираторного патогена.

[0089] Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество аденовирусного вектора в иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцине) вызывает комбинированный специфический для вируса гриппа мукозальный (как можно продемонстрировать посредством измерения IgA), гуморальный (можно продемонстрировать посредством HA1 сыворотки, см. **фиг. 10-13** (или микронейтрализующие антитела)) и клеточно-опосредованный (что может быть продемонстрировано с помощью активации Т-клеток, специфических для антиген НА вируса гриппа) иммунный ответ у субъекта-человека против вируса гриппа. Согласно

некоторым вариантам осуществления антитела сыворотки являются серологически защитными в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированный иммунный ответ обеспечивает защиту против вирус гриппа А. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированный иммунный ответ, вызванный моновалентным фармацевтическим составом против вируса гриппа согласно настоящему изобретению, обеспечивает защиту против Вирус гриппа В. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество аденовирусного вектора в иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцине) вызывает врожденный иммунный ответ, который может обеспечивать защиту против респираторных патогенов.

[0090] Согласно некоторым вариантам осуществления вирус гриппа А и/или вирус гриппа В представляет собой «сезонный» вирус гриппа, вызывающий сезонные эпидемии, в основном в зимние месяцы. Согласно другим вариантам осуществления вирус гриппа А представляет собой «пандемический» вирус гриппа, который может вызывать широко распространенное заболевание из-за новых и различных антигенных эпитопов, присутствующих в вирусе. Вирусы гриппа А делятся на подтипы на основе двух белков на поверхности вируса: гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N). Существует по меньшей мере 18 различных подтипов гемагглютинина и по меньшей мере 11 различных подтипов нейраминидазы (H1 - H18 и N1 - N11, соответственно). Вирусы гриппа А можно дополнительно разделить на различные штаммы. Существующие в настоящее время подтипы вирусов гриппа А, обнаруживаемые у людей, представляют собой вирус гриппа А (H1N1) и вирус гриппа А (H3N2). Вирусы гриппа В не делятся на подтипы, но могут быть дополнительно разделены на линии и штаммы. Циркулирующие в настоящее время вирусы гриппа В принадлежат к одной из двух линий: В/Yamagata и В/Victoria. Условные обозначения для вирусов гриппа включают несколько компонентов и придерживаются следующего подхода: антигенный тип (например, А, В, С), хозяин происхождения (например, свинья, лошадь, курица и т.д., для вирусов человеческого происхождения не указывается хозяин происхождения), географическое происхождение (например, Денвер, Тайвань и т.д.), номер штамма (например, 15, 7 и т.д.), год выделения (например, 57, 2009 и т.д.), и, для вирусов гриппа А, описание антигена гемагглютинина и нейраминидазы в скобках (например, (H1N1), (H5N1)).

[0091] Согласно иллюстративным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит генетическую вставку, кодирующую

поверхностный белок антиген НА вируса A/California/04/2009(H1N1). Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из подтипа H1N1 вируса гриппа А. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из подтипа H3N2 вируса гриппа А. Согласно другим вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из вируса гриппа В.

[0092] Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее представляет собой домашнее животное, одомашненное животное или животное для производства пищи или корма, или домашний скот, или охотничье-промысловое животное, или животное для скачек или спортивное животное, такое как корова, собака, кошка, коза, овца, кролик, или свинья или лошадь, или даже домашняя птица, такая как индейка, утки или курица. В иллюстративных вариантах осуществления субъектом-млекопитающим является человек.

[0093] *Способы применения*

[0094] Настоящее изобретение относится к способу введения через слизистую оболочку терапевтической дозы терапевтической/профилактической/иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению (например, вакцины), разработанной для вызова иммунного ответа (например, защитного иммунного ответа в качестве вакцины) посредством интраназального введения, где субъект находится в модифицированном сидячем, лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта направлены вверх и/или приподняты и/или выше головы субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержат антиген патогена для субъекта-млекопитающего.

[0095] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает вызов защитного иммунного ответа у субъекта-человека посредством интраназального введения, где субъект-человек в ходе введения находится в модифицированном положении сидя (голова запрокинута назад с приподнятыми над головой ноздрями), полулежа, лежа на спине или в другом положении, при котором ноздри субъекта направлены вверх или находятся выше уровня головы субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления ноздри находятся выше уровня головы или лба субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способы введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции (например, вакцины) субъекту,

содержащей антиген патогена для субъекта-млекопитающего, предусматривают интраназальное введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции (например, вакцины), где субъект в ходе введения находится в модифицированном положении сидя (голова запрокинута назад с приподнятыми над головой ноздрями), полулежа, лежа на спине или в другом положении, при котором ноздри субъекта направлены вверх или находятся выше уровня головы субъекта.

[0096] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-человеку, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-человеку иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем (например, голова запрокинута назад, при этом ноздри расположены над остальной частью лица субъекта), лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта находятся выше уровня головы субъекта, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно вариантам осуществления способ предусматривает введение эффективного количества по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp), аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего.

[0097] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-человеку, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-человеку иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем (например, голова запрокинута назад, при этом ноздри расположены над остальной частью лица субъекта), лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта находятся выше уровня

головы субъекта, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ.

[0098] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-человеку, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-человеку иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который не содержит и не экспрессирует (кодирует) гетерологичный антиген, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем (например, голова запрокинута назад, при этом ноздри расположены над остальной частью лица субъекта), лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта находятся выше уровня головы субъекта, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно вариантам осуществления защитный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ и обеспечивает защиту от респираторных патогенов. Согласно вариантам осуществления способ предусматривает введение эффективного количества по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp), аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего.

[0099] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-человеку, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-человеку иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который не содержит и не экспрессирует (кодирует) гетерологичный антиген, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем (например, голова запрокинута назад, при этом ноздри расположены над остальной частью лица субъекта), лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта находятся выше уровня головы субъекта, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно вариантам осуществления защитный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ и обеспечивает защиту от респираторных патогенов.

[00100] Согласно определенным вариантам осуществления после введения, когда субъект находился в модифицированном сидячем (например, голова запрокинута назад с приподнятыми над головой ноздрями), лежащем, полулежащем или другом положении, существует период выдержки после введения дозы, когда субъект остается в положении дозирования (т.е. ноздри субъекта приподняты над головой субъекта). Согласно вариантам осуществления период выдержки после введения дозы составляет от приблизительно 1 минуты до приблизительно 35 минут. Согласно вариантам осуществления, период выдержки после введения дозы составляет приблизительно 1 минуту, приблизительно 2 минуты, приблизительно 3 минуты, приблизительно 4 минуты, приблизительно 5 минут, приблизительно 7 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 12 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 17 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 22 минуты, приблизительно 25 минут, приблизительно 27 минут, приблизительно 30 минут или приблизительно 33 минуты.

[00101] Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор кодирует антиген РА *B. anthracis*, кодон-оптимизированный для человека-хозяина. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор кодирует антиген НА вируса гриппа, кодон-оптимизированный для человека-хозяина. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор кодирует белок Spike SARS-Cov-2 или его фрагмент (например, домен RBD белка S). Согласно определенным другим вариантам осуществления аденовирусный вектор не кодирует гетерологичный антиген респираторного патогена, Согласно некоторым вариантам осуществления интраназальное введение иммуногенной композиции (например, вакцины) человеку-хозяину, когда субъект находится в модифицированном сидячем (например, голова запрокинута назад с приподнятыми над головой ноздрями), лежащем, полулежащем или другом положении, при котором ноздри субъекта приподняты над головой субъекта, вызывает защитный иммунный ответ (т.е., действует в качестве вакцины), тогда как интраназальное введение иммуногенной композиции (например, вакцины), когда субъект находится в обычном сидячем положении с направленными вниз ноздрями, не вызывает защитный иммунный ответ (т.е., не действует в качестве вакцины).

[00102] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам вызова защитного иммунного ответа у субъекта-человека против вируса гриппа, посредством чего субъект-человек является серологически защищенным в течение 15 дней или в течение 28 дней после введения с интраназальной эффективной дозой приблизительно 10^8 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора согласно настоящему изобретению, кодирующего антиген вируса

гриппа. Согласно определенным вариантам осуществления защитный иммунный ответ сохраняется в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или более. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает интраназальное введение однократной дозы эффективного количества по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) дефектного по репликации аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где введение вызывает сывороточные антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения защиты против вируса сезонного гриппа. Согласно определенным другим вариантам осуществления моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения защиты против пандемического вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают защиту против инфекции, вызванной подтипами вируса гриппа А. Согласно определенным вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают защиту против инфекции, вызванной подтипами вируса гриппа А H1N1 и/или H3N2. Согласно другим вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают защиту против инфекции, вызванной вирусом гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления серологическая защита длится по меньшей мере приблизительно 13 месяцев. Согласно определенным вариантам осуществления серологическая защита длится по меньшей мере приблизительно 14 месяцев или более.

[00103] Согласно некоторым вариантам осуществления стадия введения однократной дозы (моновалентного) фармацевтического состава против вируса гриппа согласно настоящему изобретению вызывает титр антител согласно HAI 40 или более в течение 28 дней после введения и длится в течение по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев, по меньшей мере 14 месяцев или более. Согласно вариантам осуществления титр антител согласно HAI у субъекта-человека через 28 дней после вакцинации (введения фармацевтического состава против вируса гриппа согласно настоящему изобретению) составляет по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100.

[00104] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам вызова защитного иммунного ответа у субъекта-человека против коронавируса. Согласно определенным вариантам осуществления

иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержит дефектный по репликации аденовирусный вектор, содержащий экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген коронавируса или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент. Согласно определенным другим вариантам осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему изобретению содержат дефектный по репликации аденовирусный вектор, который не кодирует по меньшей мере один антиген коронавируса. Согласно определенным вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек, и антиген коронавируса происходит из SARS-CoV-2. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек, инфицированный SARS-CoV-2 (например, госпитализированный человек). Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 можно применять для лечения инфекции SARS-CoV-2 (например, у такого инфицированного и/или госпитализированного человека).

[00105] Согласно вариантам осуществления иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения лечения и/или защиты против сезонного коронавируса. Согласно определенным другим вариантам осуществления иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения лечения и/или защиты против пандемического SARS-CoV-2. Согласно вариантам осуществления лечение начинается в течение приблизительно 24 часов посредством врожденного иммунного ответа. Согласно определенным другим вариантам осуществления, иммуногенную композицию согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения защиты против SARS-CoV-2. Согласно вариантам осуществления серологическая защита длится в течение по меньшей мере приблизительно 1 месяца, 2 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 8 месяцев, 10 месяцев, 12 месяцев или по меньшей мере приблизительно 13 месяцев.

[00106] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам вызова защитного иммунного ответа у субъекта-человека против респираторных патогенов (например, вируса гриппа, *B. anthracis*, коронавируса) посредством введения однократной дозы. Согласно альтернативным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу вызова иммунного ответа против респираторных патогенов, где способ предусматривает введение по меньшей мере первой и бустерной дозы иммуногенной композиции/состава/дозы согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления бустерную дозу вводят приблизительно через 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель,

8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 недель, 22 недель, 23 недель, 24 недель, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель, 31 недель, 32 недель, 33 недель, 34 недель, 35 недель, 36 недель, 37 недель, 38 недель, 39 недель, 40 недель, 41 недель, 42 недель, 43 недель, 44 недель, 45 недель, 46 недель, 47 недель, 48 недель, 49 недель, 50 недель, 51 недель или 52 недель после введения первой дозы.

[00107] Согласно вариантам осуществления первую и бустерную дозу вводят с интервалом по меньшей мере 7 дней, с интервалом по меньшей мере 14 дней или более. Согласно вариантам осуществления первую и бустерную дозу вводят с интервалом приблизительно 7 дней, с интервалом приблизительно 14 дней, с интервалом приблизительно 20 дней, с интервалом приблизительно 25 дней, с интервалом приблизительно 30 дней, с интервалом приблизительно 35 дней, с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 50 дней, с интервалом приблизительно 55 дней, с интервалом приблизительно 60 дней или с интервалом приблизительно 65 дней. Предпочтительно, дозы вводят с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 41 дней, с интервалом приблизительно 42 дней, с интервалом приблизительно 43 дней, с интервалом приблизительно 44 дней, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 46 дней, с интервалом приблизительно 47 дней, с интервалом приблизительно 48 дней, с интервалом приблизительно 49 дней или с интервалом приблизительно 50 дней. Согласно определенным вариантам осуществления первую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом приблизительно 1 неделя, с интервалом приблизительно 2 недели, с интервалом приблизительно 3 недели, с интервалом приблизительно 4 недель, с интервалом приблизительно 5 недель, с интервалом приблизительно 6 недель, с интервалом приблизительно 7 недель, с интервалом приблизительно 8 недель, с интервалом приблизительно 9 недель, с интервалом приблизительно 10 недель, с интервалом приблизительно 11 недель или с интервалом приблизительно 12 недель. Согласно определенным другим вариантам осуществления первую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом приблизительно 1 месяц, с интервалом приблизительно 2 месяцев, с интервалом приблизительно 3 месяцев, с интервалом приблизительно 4 месяцев, с интервалом приблизительно 5 месяцев, с интервалом приблизительно 6 месяцев, с интервалом приблизительно 7 месяцев, с интервалом приблизительно 8 месяцев, с интервалом приблизительно 9 месяцев, с интервалом приблизительно 10 месяцев, с интервалом приблизительно 11 месяцев или с интервалом приблизительно 12 месяцев.

[00108] Согласно вариантам осуществления бустерные дозы являются гомологичными, что означает, что они содержат одну и ту же иммуногенную композицию. Согласно определенным вариантам осуществления способы и композиции согласно настоящему изобретению включают введение гетерологичной первой дозы вакцины и бустерной дозы, приводя к вызову иммунного ответа, где «гетерологичная» означает, что первая доза отлична от бустерной дозы. Например, иммуногенную композицию (например, аденовирусный вектор, кодирующий гетерологичный антиген) можно применять для вызова быстрого (врожденного) иммунного ответа против одного или более респираторных патогенов (например, вирус гриппа) с последующими бустерными дозами иммуногенной композиции (например, аденовирусный вектор, который кодирует или не кодирует гетерологичный антиген), где кодируемый гетерологичный антиген различен между первой дозой и бустерной дозой. Первую композицию можно вводить сначала для запуска иммунного ответа локально или системно, а вторую вакцину, такую как аденовирус, можно вводить через слизистую оболочку в качестве бустерной дозы для локального «вытягивания» примированных иммунных клеток и повторной стимуляции их антиген-специфическим образом.

[00109] Согласно вариантам осуществления первую или вторую иммуногенную композицию вводят в виде первой и бустерной доз, вводимых с интервалом по меньшей мере 7 дней, с интервалом по меньшей мере 14 дней или более. Согласно вариантам осуществления первую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом приблизительно 7 дней, с интервалом приблизительно 14 дней, с интервалом приблизительно 20 дней, с интервалом приблизительно 25 дней, с интервалом приблизительно 30 дней, с интервалом приблизительно 35 дней, с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 50 дней, с интервалом приблизительно 55 дней, с интервалом приблизительно 60 дней или с интервалом приблизительно 65 дней. Предпочтительно дозы вводят с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 41 дней, с интервалом приблизительно 42 дней, с интервалом приблизительно 43 дней, с интервалом приблизительно 44 дней, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 46 дней, с интервалом приблизительно 47 дней, с интервалом приблизительно 48 дней, с интервалом приблизительно 49 дней или с интервалом приблизительно 50 дней. Согласно определенным вариантам осуществления первую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом приблизительно 1 неделя, с интервалом приблизительно 2 недели, с интервалом приблизительно 3 недели, с интервалом приблизительно 4 недели, с интервалом приблизительно 5 недель, с интервалом

приблизительно 6 недель, с интервалом приблизительно 7 недель, с интервалом приблизительно 8 недель, с интервалом приблизительно 9 недель, с интервалом приблизительно 10 недель, с интервалом приблизительно 11 недель или с интервалом приблизительно 12 недель. Согласно определенным другим вариантам осуществления первую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом приблизительно 1 месяц, с интервалом приблизительно 2 месяца, с интервалом приблизительно 3 месяца, с интервалом приблизительно 4 месяца, с интервалом приблизительно 5 месяцев, с интервалом приблизительно 6 месяцев, с интервалом приблизительно 7 месяцев, с интервалом приблизительно 8 месяцев, с интервалом приблизительно 9 месяцев, с интервалом приблизительно 10 месяцев, с интервалом приблизительно 11 месяцев или с интервалом приблизительно 12 месяцев.

[00110] Доза иммуногенной композиции (например, вакцины) при использовании с адъювантом или без него может варьироваться от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^{12} инфекционных единиц или бляшкообразующих единиц (ifu или rfu), или единицей дозы могут быть вирусные частицы (vp), где 1 vp равна приблизительно 1-100 ifu или rfu. Согласно одному варианту осуществления доза иммуногенной композиции, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10^7 vp. Согласно другому аспекту доза иммуногенной композиции, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10^8 vp. Согласно другому аспекту доза иммуногенной композиции, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10^9 vp. Согласно другому аспекту доза иммуногенной композиции, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10^{10} vp. Согласно другому аспекту доза иммуногенной композиции, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10^{11} vp. Согласно другому аспекту доза иммуногенной композиции, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет приблизительно или по меньшей мере приблизительно 10^{12} vp.

[00111] Согласно вариантам осуществления для введения мукозального введения (введения через слизистую оболочку) композиции могут быть в форме и дозироваться с помощью дозатора-распылителя, помпового дозатора, многодозового дозатора, дозатора капельного типа, распылителя или аэрозольного дозатора. Аэрозоли обычно находятся под давлением с помощью углеводорода. Помповые дозаторы предпочтительно могут выдавать отмеренную дозу или дозу, имеющую конкретный размер частиц.

[00112] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей антиген патогена, субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции (например, вакцины), где субъект в ходе введения находится в сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит нереплицирующийся вирусный вектор, который кодирует гетерологичный антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирус представляет собой аденовирус человека. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирус представляет собой аденовирус крупного рогатого скота, собачий аденовирус, аденовирус не относящихся к человеку приматов, куриный аденовирус или аденовирус свиней или поросят. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией E1 и/или E3. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту-млекопитающему интраназально вводят иммуногенную композицию (например, вакцину), содержащую эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего.

[00113] Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном является респираторный патоген. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном является вирус. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусом является ортомиксовирус, парамиксовирус, риновирус или коронавирус. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусом является вирус гриппа, синцитиальный респираторный вирус (RSV), вирусная инфекция верхних дыхательных путей или вирус кори. Согласно

некоторым вариантам осуществления вирусная инфекция верхних дыхательных путей представляет собой риновирус или коронавирусы. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном является бактерия. Согласно некоторым вариантам осуществления бактерия выбрана из группы, состоящей из *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* и *Mycoplasma*. Согласно некоторым вариантам осуществления бактерией является *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном является протективный антиген *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления протективный антиген *B. anthracis* представляет собой PA83. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном является фактор летальности *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном является грибок. Согласно некоторым вариантам осуществления грибом является *Aspergillus*. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном является антиген вируса гриппа, необязательно где антиген вируса гриппа происходит из вируса сезонного гриппа, вируса гриппа А, и/или вируса гриппа В, и/или антиген вируса гриппа антиген поверхностный белок гемагглютинин (НА).

[00114] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая доза иммуногенной композиции (например, вакцины) содержит моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа, подходящий для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, причем иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ, предназначенный для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку с титром антител согласно НА1 ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления состав разработан для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку с титром антител согласно НА1 ≥ 40 в течение по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, против вируса гриппа, где необязательно титр антител согласно НА1 составляет по меньшей мере 50 и/или в течение 28 дней после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp).

[00115] Согласно некоторым вариантам осуществления состав не содержит адъювант. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген HA вируса гриппа происходит из вируса гриппа А, где обязательно вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1 и/или подтип H3N2. Согласно некоторым вариантам осуществления способ вызывает серологически защитный иммунный ответ, который длится в течение по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления способ вызывает комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ, который обеспечивает защиту против подтипов вирус гриппа А и вирус гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-млекопитающий представляет собой домашнее животное, одомашненное животное, животное для производства пищи или корма, домашний скот, охотничье-промысловое животное, животное для скачек или спортивное животное. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является корова, лошадь, кролик, собака, кошка, коза, овца или свинья. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек, где обязательно человек является взрослым. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-человек инфицирован SARS-CoV-2 и/или проявляет симптомы COVID-19. Согласно предпочтительным вариантам осуществления способ может предотвращать клиническое ухудшение у субъекта-человека с ранней коронавирусной инфекцией (предпочтительно инфекцией SARS-CoV-2). Другие варианты осуществления также охватываются настоящим изобретением, как очевидно специалисту в данной области техники.

[00116] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора (например, вакцины) субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере приблизительно 10^8 vp, по меньшей мере приблизительно 10^9 vp, по меньшей мере приблизительно 10^{10} vp или по меньшей мере приблизительно 10^{11} vp аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует кодирующую последовательность гетерологичного антигена, кодон-оптимизированную для субъекта-млекопитающего, где субъект в ходе введения находится в сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-

млекопитающего направлены вверх, и посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ (т.е., действует в качестве вакцины). Согласно предпочтительным вариантам осуществления «гетерологичный антиген» является гетерологичным в отношении инфекционного агента, для которого иммуногенная композиция предназначена для обеспечения защиты. Например, применение NasoVAX. Раскрытой в настоящем документе, для обеспечения защиты против инфекции, вызванной SARS-CoV-2, или симптомов COVID-19, охватывает применение гетерологичного антигена (т.е., антигена вируса гриппа, используемого для профилактики, лечения и/или облегчения симптомов инфекции SARS-CoV-2, включая COVID-19). Согласно некоторым вариантам осуществления кодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один антиген патогена, выбранного из группы, состоящей из респираторного патогена, вируса, ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса, коронавируса, вируса гриппа, которым необязательно является вирус сезонного гриппа, вирус гриппа А и/или вирус гриппа В, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей, вируса кори, бактерии, необязательно выбранной из группы, состоящей из *Bacillus*, как например *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* и *Mycoplasma*, гриба, который необязательно представляет собой *Aspergillus*. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном является протективный антиген *Bacillus anthracis*, необязательно PA83 и/или фактор летальности *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном является антиген вируса гриппа, необязательно антиген поверхностный белок гемагглютинин (НА), и композиция разработана для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку с титром антител согласно НА1 ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, где необязательно титр антител согласно НА1 составляет по меньшей мере 50 и/или в течение 28 дней после введения, эффективное количество составляет по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp), композиция не содержит адъювант, антиген НА вируса гриппа происходит из вируса гриппа А, где необязательно вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1 и/или подтип H3N2, где способ вызывает серологически защитный иммунный ответ, который длится в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 13 или 14 месяцев, и/или способ вызывает комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ, который обеспечивает защиту против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В.

[00117] Согласно некоторым вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение иммуногенной композиции в виде двух

доз, разделенных приблизительно равным образом между двумя ноздрями субъекта-млекопитающего, где субъект-млекопитающий находится в дорсальном (т.е., лежащем) положении. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-млекопитающий находится в лежащем положении в ходе введения и остается в лежащем положении в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления способ доставляет интраназальную номинальную дозу по меньшей мере приблизительно 1×10^{11} вирусных частиц (vp) (например, лекарственного продукта NasoVAX). Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение приблизительно 0.5 мл дозы лекарственного продукта NasoVAX (предпочтительно размороженного до комнатной температуры, приблизительно 25°C) для доставки 0.25 мл интраназального спрея в каждую ноздрю субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген (т.е., патогена или гетерологичный антиген (гетерологичный по отношению к инфекционному агенту, против которого иммуногенная композиция предназначена вызывать иммунный ответ)) представляет собой антиген вируса гриппа, где необязательно антиген вируса гриппа представляет собой поверхностный антиген гемагглютинин (HA). Согласно некоторым вариантам осуществления антиген представляет собой антиген вируса гриппа, и субъектом-млекопитающим является человек с ранним коронавирусным инфекционным заболеванием (т.е., ранний COVID-19). Согласно некоторым вариантам осуществления такие способы предотвращают клиническое ухудшение у человека, где клиническое ухудшение представляет собой по меньшей мере приблизительно 4,0% снижение от исходного уровня показателя сатурации SpO₂ в состоянии покоя, как определено посредством мобильной пульсовой оксиметрии при двух последовательных измерениях после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления клиническое ухудшение можно определить посредством измерения по меньшей мере одного показателя, выбранного из группы, состоящей из максимальной тяжести COVID-19 после лечения как оценено посредством среднего снижения показателя сатурации SpO₂ в состоянии покоя от исходного уровня показателя сатурации SpO₂ в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней после введения, среднего увеличения показателя частоты пульса в состоянии покоя от исходного уровня показателя частоты пульса в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней после введения, доли пациентов, нуждающихся в госпитализации на день 42 после введения в соответствии с требуемым уровнем сатурации, и/или общей летальности на день 42 после введения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления субъект-млекопитающий, которому вводят иммуногенную композицию, не показывает серьезные нежелательные явления после введения.

[00118] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции, содержащей антиген патогена субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении дозирования, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ, где необязательно иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) вызова у субъекта-млекопитающего защитного иммунного ответа, предусматривающему (предусматривающим) интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции субъекту-млекопитающему, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения субъект-млекопитающий находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение от приблизительно 1 до приблизительно 35 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) вакцинации пациента (тип субъекта-млекопитающего) против вирусной инфекции, предусматривающему (предусматривающим) интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции пациенту, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для пациента, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, где ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и инструктирование или иное предупреждение пациента сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение от приблизительно 1 до приблизительно 35 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) лечения вирусной инфекции у пациента (тип субъекта-млекопитающего), предусматривающему

(предусматривающим) интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции пациенту, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для пациента, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, где ноздри пациента направлены вверх, и инструктирование или иное предупреждение пациента сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение от приблизительно 1 до приблизительно 35 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления ноздри субъекта-млекопитающего находятся выше головы субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления способы могут дополнительно предусматривать инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять положение дозирования в течение периода выдержки после введения дозы, выбранного из от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут. Согласно некоторым вариантам осуществления менее приблизительно 20% терапевтической дозы покидают носовую полость в результате вытекания наружу. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию можно вводить в виде однократной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию можно вводить в виде разделенной дозы в каждую ноздрю, где необязательно разделенная доза вводят с использованием многодозового устройства интраназальной доставки. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию можно обеспечивать в виде первой дозы и бустерной дозы, где необязательно иммуногенную композицию обеспечивают в виде режима дозирования в комбинации с гетерогенной дозой в виде первой дозы или бустерной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор, который кодирует и экспрессирует гетерологичный антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор без кодирования гетерологичного антигена. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция содержит нереплицирующийся аденовирусный вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусом может быть аденовирус человека. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирус может быть выбран из группы, состоящей из аденовируса крупного рогатого скота, собачьего аденовируса, аденовируса не относящихся к человеку приматов, куриного аденовируса или аденовируса свиней и поросят. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор может представлять собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3. Согласно некоторым вариантам осуществления

эффективное количество может быть выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией E1 и/или E3, по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3 и по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту-млекопитающему можно интраназально вводить иммуногенную композицию, содержащую эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном может быть респираторный патоген. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном может быть вирус, который согласно некоторым вариантам осуществления может быть выбран из группы, состоящей из ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса и коронавируса. Согласно некоторым вариантам осуществления коронавирус может быть выбран из группы, состоящей из SARS-Cov, SARS-Cov-2, MERS, коронавирусов человека 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 и HKU1. Согласно некоторым вариантам осуществления вирус выбран из группы, состоящей из вируса гриппа, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей и вируса кори. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусная инфекция верхних дыхательных путей может представлять собой риновирус или коронавирус. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном может быть бактерия. Согласно некоторым вариантам осуществления бактерия может быть выбрана из группы, состоящей из *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* и *Mycoplasma*. Согласно некоторым вариантам осуществления бактерией может быть *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном является протективный антиген *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления протективный антиген *Bacillus anthracis* может представлять собой PA83. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном может быть фактор летальности *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления патогеном может быть гриб. Согласно некоторым вариантам осуществления гриб может представлять собой *Aspergillus*. Согласно некоторым вариантам осуществления антигеном может быть антиген вируса гриппа, выбранный из группы, состоящей из антигена вируса сезонного гриппа, антигена вируса гриппа А, антигена вируса гриппа В. Согласно

некоторым вариантам осуществления антигеном может быть антиген поверхностный белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа или его фрагмент.

[00119] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая доза иммуногенной композиции, вводимая, как раскрыто в настоящем документе, содержит моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа, подходящий для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, причем иммуногенная композиция содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ, предназначенный для обеспечения серологической защиты человека-субъекта с титром антител согласно анализу ингибирования гемагглютинации (НАИ) ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение обеспечивает а) состав, разработанный для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку с титром антител согласно НАИ ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, где необязательно титр антител согласно НАИ составляет по меньшей мере 50 и/или в течение 28 дней после введения, б) эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp), с) состав, который не содержит адьювант, d) антиген НА вируса гриппа, который происходит из вируса гриппа А, где необязательно вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1 и/или подтип H3N2, е) способ, вызывающий серологически защитный иммунный ответ, длящийся в течение по меньшей мере 12 месяцев, f) способ, вызывающий комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ и обеспечивающий защиту против вируса гриппа А и вируса гриппа В подтип, и/или, g) иммунный ответ, измеряемый посредством анализа ингибирования гемагглютинации (НАИ), а также способы их применения.

[00120] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему иммуногенной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, содержащего и экспрессирующего или не содержащего и не экспрессирующего гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего, где субъект в ходе введения находится

в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении дозирования, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ, где необязательно иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

[00121] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) вызова у субъекта-млекопитающего защитного иммунного ответа, предусматривающему (предусматривающим) интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции субъекту-млекопитающему, где иммуногенная композиция содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, кодирующего или не кодирующего гетерологичный антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения субъект-млекопитающий находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение от приблизительно 1 минуты до приблизительно 30 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) вакцинации пациента против вирусной инфекции, предусматривающему (предусматривающим) интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции пациенту, где иммуногенная композиция содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, кодирующего или не кодирующего гетерологичный антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри пациента направлены вверх, и, инструктирование или иное предупреждение пациента сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение приблизительно от 1 минуты до приблизительно 30 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента (относящегося к типу субъекта-млекопитающего). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) лечения вирусной инфекции у пациента, предусматривающему (предусматривающим) интраназальное введение эффективного количества

терапевтической дозы иммуногенной композиции пациенту, где иммуногенная композиция содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, кодирующего или не кодирующего гетерологичный антиген патогена для субъекта-млекопитающего, где в ходе интраназального введения пациент находится в модифицированном сидячем, полулежащем или лежащем положении, при котором ноздри пациента направлены вверх, и инструктирование или иное предупреждение пациента сохранять модифицированное сидячее, полулежащее или лежащее положение в течение от приблизительно 1 минуты до приблизительно 30 минут после интраназального введения, посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у пациента (относящегося к типу субъекта-млекопитающего). Согласно некоторым вариантам осуществления ноздри субъекта-млекопитающего могут быть выше уровня головы субъекта-млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления способ может дополнительно предусматривать инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять положение дозирования в течение периода выдержки после введения дозы, выбранного от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут. Согласно некоторым вариантам осуществления менее приблизительно 20% фармацевтической композиции покидают носовую полость в результате вытекания наружу. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию можно вводить в виде однократной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию можно вводить в виде разделенной дозы в каждую ноздрю, которую необязательно можно вводить с применением многодозового устройства интраназальной доставки. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция может быть обеспечена в виде первой дозы и бустерной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенная композиция может быть обеспечена в виде режима дозирования в комбинации с гетерогенной дозой в виде первой дозы или бустерной дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления защитный иммунный ответ может быть вызван в течение приблизительно 24 часов. Согласно некоторым вариантам осуществления защитный иммунный ответ может быть вызван в течение приблизительно 1 или 2 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусом может быть аденовирус человека. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирус может быть выбран из группы, состоящей из аденовируса крупного рогатого скота, собачьего аденовируса, аденовируса не относящихся к человеку приматов, куриного аденовируса или аденовируса свиней и поросят. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор может представлять собой

аденовирусный вектор с делецией E1 и E3. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество может быть выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3 и по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) аденовируса с делецией или нарушением E1 и/или E3. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген может происходить из респираторного патогена. Согласно некоторым вариантам осуществления респираторным патогеном может быть вирус. Согласно некоторым вариантам осуществления вирус может быть выбран из группы, состоящей из ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса и коронавируса. Согласно некоторым вариантам осуществления коронавирус может быть выбран из группы, состоящей из SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS, коронавируса человека 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 и HKU1. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть выбран из группы, состоящей из вируса гриппа, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей и вируса кори. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусная инфекция верхних дыхательных путей может представлять собой риновирус или коронавирус. Согласно некоторым вариантам осуществления респираторным патогеном может быть бактерия, выбранная из группы, состоящей из *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* и *Mycoplasma*. Согласно некоторым вариантам осуществления респираторный патоген может представлять собой грибок, которым является необязательно *Aspergillus*. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген может представлять собой протективный антиген *Bacillus anthracis*, необязательно PA83 и/или фактор летальности *Bacillus anthracis*. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген может представлять собой антиген вируса гриппа, необязательно антиген поверхностный белок гемагглютинин (HA), и: а) композиция разработана для обеспечения серологической защиты субъекту-млекопитающему с титром антител согласно HA1 ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, где необязательно титр антител согласно HA1 составляет по меньшей мере 50 и/или в течение 28 дней после введения, б) эффективное количество составляет по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp), в) композиция не содержит адъювант, г) антиген HA вируса гриппа происходит из вируса гриппа А, где необязательно вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1 и/или подтип H3N2, д) способ вызывает серологически защитный иммунный ответ, длящийся в течение по меньшей мере 12 месяцев, и/или, е) способ вызывает комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ, обеспечивает

защиту против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе способы предусматривают интраназально введение в ноздри субъекта-человека эффективного количества иммуногенной композиции, где в ходе введения ноздри субъекта-человека направлены вверх, и эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ против респираторного патогена. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество содержит по меньшей мере приблизительно 10^9 ур. Согласно некоторым вариантам осуществления иммуногенную композицию можно вводить в виде двух доз, разделенных приблизительно равным образом между двумя ноздрями субъекта-человека. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-человек может быть в лежачем положении в ходе введения и остается в лежачем положении в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичным антигеном может быть антиген вируса гриппа, где необязательно антиген вируса гриппа представляет собой антиген поверхностный гемагглютинин (НА). Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген представляет собой антиген коронавируса, где необязательно антиген коронавируса представляет собой антиген SARS-Cov-2. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор, дефектный по репликации, не содержит и не экспрессирует гетерологичный антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-человек представляет собой человека с ранним коронавирусным инфекционным заболеванием. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе способы могут предотвращать клиническое ухудшение у человека, которое согласно предпочтительным вариантам осуществления может быть определено как по меньшей мере приблизительно 4,0% снижение от исходного уровня показателя сатурации SpO_2 , как определено посредством пульсовой оксиметрии при двух последовательных измерениях после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления клиническое ухудшение может быть определено посредством измерения по меньшей мере одного показателя, выбранного из группы, состоящей из максимальной тяжести COVID-19 после лечения как оценено посредством среднего снижения показателя сатурации SpO_2 в состоянии покоя от исходного уровня показателя сатурации SpO_2 в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней после введения, среднего повышения показателя частоты пульса в состоянии покоя от исходного уровня показателя частоты пульса в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней после введения, доли пациентов, нуждающихся в госпитализации на день 42 после введения в соответствии с требуемым уровнем сатурации, и общей летальности до дня 42 после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления защитный иммунный ответ

против респираторного патогена может возникать в течение приблизительно 24 часов. Согласно некоторым вариантам осуществления защитный иммунный ответ против респираторного патогена может возникать в течение приблизительно 1 - 2 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение 30 минут после интраназального введения.

[00122] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу (способам) введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора субъекту-человеку, где способы предусматривают интраназальное введение субъекту-млекопитающему иммуногенной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, содержащего и экспрессирующего или не содержащего и не экспрессирующего кодирующую последовательность гетерологичного антигена, кодон-оптимизированную для субъекта-млекопитающего, где субъект-человек в ходе введения находится в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-человека направлены вверх, посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ против респираторного патогена. Согласно некоторым вариантам осуществления респираторный патоген выбран из группы, состоящей из ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса, коронавируса, вируса гриппа, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей и вируса кори. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирусный вектор, дефектный по репликации, содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, выбранный из антигена вируса гриппа или антигена коронавируса. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген представляет собой антиген SARS-Cov-2. Согласно некоторым вариантам осуществления гетерологичный антиген представляет собой антиген вируса гриппа.

[00123] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-млекопитающий, подлежащий лечению способами и/или применению реагентов (например, векторов), раскрытый в настоящем документе, представляет собой домашнее животное, одомашненное животное, животное для производства пищи или корма, домашний скот, охотничье-промысловое животное, животное для скачек или спортивное животное. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является корова, лошадь, собака, кошка, коза, овца или свинья. Согласно некоторым

вариантам осуществления субъектом-млекопитающим является человек, где необязательно человек является взрослым. Другие варианты осуществления также рассматриваются в настоящем документе, как это будет понятно специалистам в данной области техники.

Примеры

[00124] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области полную информацию и описание того, как использовать представленные в настоящем документе конкретные варианты осуществления, и не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия и представления того, что приведенные ниже примеры являются всеми экспериментами или единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, доли являются объемными долями, а температура указана в градусах Цельсия. Следует понимать, что изменения в способах, как описано, могут быть сделаны без изменения фундаментальных аспектов, которые должны быть проиллюстрированы примерами.

[00125] Пример 1. Получение фармацевтического состава иммуногенной композиции против сибирской язвы (NasoShield)

[00126] Аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению представляет собой дефектный по репликации (RD)-Ad5 вектор с делецией E1/E3, который экспрессирует представляющий интерес белок (например, *B. anthracis* PA) в респираторных эпителиальных клетках и/или других органах/тканях. Вектор содержит генетическую вставку, такую как трансген, кодирующий ген PA83 (протективный антиген - форма 83 кДа) из *B. anthracis* (или любой другой ген, представляющий интерес для трансгенеза). В рекомбинантном векторе Ad5 отсутствует область E1 вирусного генома, которая делает вирус дефектным по репликации (RD) и неспособным продуцировать инфекционные вирусные частицы при попадании в клетку-хозяина. Дополнительная делеция нуклеотидов в области E3 вектора удаляет гены, которые участвуют в уклонении от иммунного ответа хозяина и являются необязательными для репликации вируса. Экспрессионная кассета, состоящая из энхансера/промотора транскрипции цитомегаловируса для управления экспрессией гена PA83 (или другого специфического трансгена) и сигнала полиаденилирования вируса обезьяны 40, была вставлена вместо последовательностей гена E1. На **фиг. 1** приведено схематическое изображение вектора RD-Ad5 и указаны те последовательности исходного генома аденовируса, которые сохраняются в векторе.

[00127] Протективный антиген (РА) играет ключевую роль в заболевании сибирской язвой, связываясь с клетками-хозяина и объединяясь с 1 из 2 других белков с образованием экзотоксинов, ответственных за гибель клеток [Wright 2010]. Хорошо известно, что антитела к протективному антигену РА критически важны для предотвращения заболевания сибирской язвой. TNA является ключевым биомаркером и основой для утверждения ветеринарными правилами в настоящее время лицензированной иммуногенной композиции против сибирской язвы (например, вакцины) (Moldovan IR, Tary-Lehmann M. Improving immunogenicity, efficacy and safety of vaccines through innovation in clinical assay development and trial design: the Phacilitate Vaccine Forum, Washington D.C. 2011. Hum Vaccin. 2011 Jun,7(6):610-2).

[00128] Дефектный по репликации аденовирусный вектор, содержащий и экспрессирующий протективный антиген (РА) *B. anthracis*, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего, получали в соответствии с процедурами, подробно описанными в [Lui J. et al.; A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system; Nat. Protoc. (2007) 2(5):1236-47].

[00129] NasoShield получали путем размножения вектора RD-Ad5 в клетках PER.C6, допускающих репликацию, с последующей очисткой вируса от урожая инфицированных клеток, а конечный продукт включал следующие вспомогательные вещества: трис-HCl (pH 7,4), гистидин, сахароза, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусная кислота и этанол.

[00130] Для клинического исследования (**Пример 2**) NasoShield поставляли в одноразовых стеклянных флаконах, каждый из которых содержал номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), составленной для обеспечения номинальной дозы 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} вирусных частиц (vp).

[00131] Для исследования на животных (**Пример 3**) NasoShield (также обозначаемая, как AdVAV в более ранних исследованиях) поставляли в одноразовых стеклянных флаконах, каждый из которых содержал номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей 1.5×10^9 vp (номер партии: 17255-001).

[00132] **Пример 2. Первое исследование Фазы 1 на людях для оценки безопасности и иммуногенности NasoShield**

[00133] Первое исследование Фазы 1 на людях проводили для оценки безопасности и иммуногенности NasoShield. Цель исследования заключалась в том, чтобы

оценить безопасность и иммуногенность NasoShield, связанную с специфическим гуморальным иммунным ответом на протективный антиген (РА) после введения NasoShield в качестве интраназального спрея в виде однократной дозы 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp и в виде 2 доз (с интервалом в 3 недели) с самым высоким хорошо переносимым содержанием вирусных частиц (например, 1×10^{11} vp), где испытуемые находились в нормальном положении сидя (т.е., глаза были сфокусированы прямо перед собой на объекте на уровне глаз, а ноздри направлены вниз) при введении NasoShield.

[00134] NasoShield поставляли в одноразовых стеклянных флаконах, каждый из которых содержал номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), приготовленной для обеспечения номинальных доз 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp. Наименьшую дозу (1×10^8 vp) готовили в местной аптеке путем разбавления флакона с 1×10^9 vp соответствующим количеством буфера-разбавителя в контролируемой асептической зоне. Дозу 0,5 мл разделяли для введения в две ноздри («разделенная доза») и вводили в виде интраназального спрея с использованием туберкулинового шприца на 1 мл, снабженного устройством для интраназального распыления на слизистую оболочку носа Teleflex LMA™ MAD® (LMA MAD) в день 1 (когорты с однократной дозой, часть А испытания) или в дни 1 и 22 (когорта с двойной дозой, часть В испытания). Исследуемая популяция состояла из здоровых, иммунокомпетентных взрослых в возрасте от 18 до 49 лет. Субъектам этого клинического испытания вводили NasoShield в обычном положении сидя.

[00135] В части А этого клинического испытания 120 субъектов клинического исследования включали в 4 последовательные когорты по 30 испытуемых, каждая из которых определялась дозой NasoShield (1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp). В каждой когорте (и контрольной группе в когорте однократной дозы) испытуемых рандомизировали в соотношении 4:1:1 для получения 1 интраназальной дозы NasoShield (день 1), одной интраназальной дозы (т.е. интраназального спрея) плацебо (день 1). В части В этого клинического испытания 25 субъектов клинического исследования рандомизировали в соотношении 4:1 для получения двух интраназальных доз (т.е. с помощью интраназального спрея) NasoShield в самой высокой хорошо переносимой дозе из части А (1×10^{11} vp) или плацебо с интервалом в 21 день (дни 1 и 22).

[00136] Запланированный промежуточный анализ проводили, когда все данные за день 57 посещения в части В (через 35 дней после введения дозы 2) были доступны, проверены для всех субъектов клинического исследования и подтверждены исследователем для всех испытуемых. Отчетные периоды для событий реактогенности и нежелательных явлений (АЕ), отличных от серьезных нежелательных явлений (SAE),

нежелательных явлений с медицинским обращением (MAE) и новых хронических заболеваний (NCI), были завершены для всех субъектов клинического исследования во время промежуточного анализа. Статистически значимой разницы между общей группой NasoShield и группой плацебо в частоте случаев локальной реактогенности ($P = 0,439$) или системной реактогенности ($P = 0,573$) после любой дозы не было. Вектор Ad5 выводился из носоглотки у большинства субъектов клинического исследования, которые получили NasoShield в части А (92,0%), ко дню 8 и у всех субъектов клинического исследования ко дню 15 (примечание: образцы части В не тестировали). Количество субъектов клинического исследования с любым выделением и величина выделения зависели от дозы на день 4 и 8.

[00137] В части А только несколько субъектов клинического исследования в группах NasoShield соответствовали определению респондента (≥ 4 -кратное увеличение через 28 дней после введения дозы) для иммуноглобулина G (IgG) или антител, нейтрализующих токсин (TNA). В части В 10 субъектов клинического исследования (66,7%) в группе NasoShield 1×10^{11} vp соответствовали определению ответа IgG после дозы 1 и 9 субъектов (60,0%) после дозы 2, однако, у тех, кто соответствовал определению респондента, были очень низкие геометрические значения титров (GMT). Как в части А, так и в части В только несколько субъектов клинического исследования в группах NasoShield соответствовали определению респондента для NF_{50} или ED_{50} TNA. На день 29 NasoShield в любой дозе вызывал IgG ответ только у 21,0% субъектов клинического исследования и TNA ответ, измеренный с помощью NF_{50} и ED_{50} , у 3,7% и 5,4% субъектов клинического исследования, соответственно. Таким образом, анализы иммуногенности показали минимальный ответ иммуноглобулина G (IgG), вызываемый NasoShield через 28 дней после введения одной дозы (день 29) или двух доз (день 50). Ни у одного субъекта клинического исследования из групп с дозой 1×10^{10} или 1×10^{11} vp и у очень небольшого числа субъектов клинического исследования из групп с более низкой дозой не было выявлено реакции токсин нейтрализующих антител (TNA). См. фиг. 2. Ограниченный ответ на NasoShield затруднял оценку влияния уровней антител к Ad5 в сыворотке крови до введения дозы на иммунный ответ. Следует еще раз отметить, что в этом клиническом испытании NasoShield вводили субъектам клинического исследования, находящимся в обычном положении сидя (т.е. ноздри не были запрокинуты назад или в лежачем положении). Эти результаты были неожиданными и несовместимыми с предыдущими исследованиями на животных и клиническими испытаниями NasoVAX, интраназальной вакцины против гриппа, основанной на том же векторе RD-Ad5, и при использовании того же устройства для введения вакцины (устройство для интраназального распыления на

слизистую оболочку носа LMA MAD Nasal Intranasal Mucosal Atomization Device) и процедур.

[00138] Пример 3. Различия в иммуногенности при позиционном введении NasoShield новозеландским белым (NZW) кроликам

[00139] Данные по иммуногенности, полученные в ходе клинического исследования (**Пример 2**), контрастировали с высокими уровнями реакции антител, нейтрализующих токсин (TNA), наблюдавшимися в доклинических исследованиях даже при очень низких дозах NasoShield. См. **фиг. 3**. Начинали исследование, чтобы найти потенциальную первопричину (причины), которая могла привести к такому результату в клиническом исследовании. В рамках исследования оценили эффективность продукта, компоненты состава, профиль загрязнения, а также другие ключевые параметры. Средство доставки, способ интраназального введения и место введения изучали в исследовании на кроликах, чтобы определить различия, если таковые имеются, в иммуногенности, создаваемой NasoShield, которые могут быть связаны с любым из указанных выше параметров или могут зависеть от них.

[00140] На **фиг. 4** представлено краткое описание плана клинического исследования. Кроликов вакцинировали в стернальном положении (ноздри направлены вниз в нормальном положении покоя, что соответствует нормальному положению сидя в клиническом исследовании на людях в **Примере 2**) и в дорсальном положении (кролики лежат на спине с ноздрями вверх, что соответствует лежащему положению в клиническом исследовании на людях в **Примерах 5 и 6**) с применением устройства для интраназальной доставки, использованного в клиническом исследовании в **Примере 2**. Группа сравнения представляла собой группу с закапыванием (капли) NasoShield, вводившемся в дорсальном положении. Этот тип введения использовали во время доклинических исследований до начала клинического испытания. Вирусные частицы NasoShield (vp) вводили в жидкой форме с использованием ингалятора или аэрозольного аппарата (Aerogen или LMA MAD/MAD300) кроликам в дорсальном и стернальном положениях. Количество вводимых вирусных частиц составляло 3×10^8 при варьировании устройством и положением для контрольной группы, получавшей только буфер, и сравнительной группы с меньшим количеством вирусных частиц, получавшей 3×10^7 вирусных частиц и использующей ингалятор AeroGen. Положение грудины у кроликов наиболее точно имитирует нормальную сидячую позу человека (с ноздрями, направленными вниз или слегка наклоненными), которая была реализована для введения NasoShield в ходе клинического испытания.

[00141] Иммуногенность NasoShield оценивали с помощью двух анализов: твердофазного иммуноферментного анализ антител класса IgG к протективному антигену PA (ELISA), который измеряет уровни IgG, специфичные для PA, и анализа нейтрализации токсина (TNA), функционального анализа, который измеряет и количественно определяет способность сыворотки нейтрализовать фактор летальности *B. anthracis* (LT). Настоящее исследование разработали для сравнения иммуногенности NasoShield при введении кроликам NZW путем интраназального закапывания жидкости, распыления с помощью LMA MAD® или распыления с помощью интраназального небулайзера, предназначенного для введения иммуногенной композиции (например, вакцины), но при различных позициях для учета введения в стернальном и дорсальном положениях, а затем эффективности вводимых доз, измеряемую выживаемостью после провокационной дозы Эймса летальной ингаляции спорами *B. anthracis*.

[00142] Анализы нейтрализации токсина (TNA) оценивали способность антител в образце сыворотки защищать клетки в культуре от токсина. Согласно одному варианту осуществления токсин представлял собой летальный фактор *B. anthracis* (LT). Клетки подвергали воздействию образцом сыворотки, обычно от иммунизированного животного, которую разбавляли в планшете. Затем добавляли токсин и инкубировали клетки. Любые живые клетки можно визуализировать с помощью таких реагентов, как бромид дифенилтетразолия (МТТ), который будет метаболизироваться живыми клетками с образованием яркого цвета (в результате МТТ-теста получают кристаллы формазана фиолетового цвета). Чем ближе к гибели находятся клетки, тем меньше будет проявляться (т.е. обнаруживаться) окраска. Полностью мертвые клетки не дадут окраски. В присутствии любого антитела к токсину, антитело должно связываться с токсином, что поможет уменьшить действие токсина на клетки и предотвратить их отмирание. Затем планшеты, на которых выросли клетки, можно проанализировать с помощью планшет-ридера, чтобы оценить абсорбцию в каждой лунке и, следовательно, концентрацию, при которой токсин приводит к гибели половины клеток.

[00143] ED₅₀ TNA и NF₅₀ TNA от вакцинированных кроликов оценивали в валидированном анализе TNA на 28 день после вакцинации. **См. фиг. 5.**

[00144] Данные показали, что как LMA MAD, так и закапывание были способны генерировать ответ TNA. Однако только при введении в дорсальном положении с использованием LMA MAD (MAD300) или модельных небулайзеров AeroGen иммунный ответ мог быть вызван. **См. фиг. 4.**

[00145] У всех 24 протестированных животных введение иммуногенной композиции (например, вакцины) в стернальном положении (т.е. не в лежачем положении;

а в обычном положении сидя) не вызывало иммуногенного ответа в анализе TNA. Кроме того, даже в 10 раз более низкая доза с использованием другого устройства (Aerogen), но в дорсальном положении (т.е. лежащем), вызывала соответствующий дозе иммунный ответ. Это указывает на то, что положение введения (например, положение головы/ноздрей при интраназальном введении) является критическим параметром для создания иммуногенного ответа на интраназально вводимую иммуногенную композицию (например, вакцину) и потенциально другие терапевтические средства. Данные показывают, что наклон головы (т.е. ноздри под углом вверх или над головой, дорсальное положение или лежащее положение) может позволить терапевтическому средству/иммуногенной композиции (например, вакцине) получить доступ и/или локализоваться в определенных областях носовых ходов, пазух и прилегающих тканей/органов, что может иметь решающее значение для создания иммунного ответа. Таким образом, наклон головы назад с направленными вверх ноздрями и подбородком является предпочтительным положением для введения NasoShield. Области, к которым осуществляется доступ при интраназальном введении в стеральной/нормальной позе сидя (т.е. с ноздрями, не направленными вверх), могут отличаться и/или быть неоптимальными для создания сильного иммунного ответа.

[00146] Данные о выживаемости кроликов после иммунизации NasoShield и заражения спорами показаны на **фиг. 7**. Группы кроликов, по 24 в группе, обрабатывали различным количеством вирусных частиц с помощью небулайзера AeroGen (группы 1 и 2) в дорсальном положении, небулайзера MAD300 в стеральном и дорсальном положении, соответственно (группы 3 и 4), без устройства в дорсальном положении, т.е. посредством закапывания (группа 5), а в качестве контроля кроликов обрабатывали только буферным раствором путем закапывания (группа 6). Наименьшую смертность 21% (выживаемость 79%) наблюдали у кроликов, которым вводили иммуногенную композицию (например, вакцину) с помощью прибора MAD300 и когда располагали кролика в дорсальном положении (т.е. действовала как вакцина). Введение с использованием прибора MAD 300 в стеральном положении не обеспечивало защиты от сибирской язвы со 100% смертностью (нулевая выживаемость), аналогично буферному контролю (т.е. ни одно из них не действовало как вакцина). Небулайзер AeroGen в дорсальном положении был не так эффективен, как прибор MAD300 в дорсальном положении, с более высоким уровнем смертности 46% при сопоставимом количестве вирусных частиц и даже более высоким уровнем смертности, 71%, когда количество вирусных частиц было снижено до 3×10^7 . Однако, он по-прежнему обеспечивалась некоторая степень защиты от заражения сибирской язвой, лучше, чем введение в стеральном положении с использованием MAD300.

[00147] Сравнение результатов TNA с данными о смертности кроликов для каждой группы представлено на **фиг. 8**, где реакция TNA обычно соответствует выживаемости кроликов, вакцинированных NasoShield и зараженных спорами сибирской язвы.

[00148] Положение субъекта во время введения иммуногенных агентов, такое, что ноздри направлены вверх или приподняты приблизительно над головой субъекта, как при модифицированном сидячем, полулежачем и/или лежачем положении, коррелирует с созданием сильного иммуногенного ответа при интраназальном введении иммуногенной композиции (например, вакцины)/терапевтического средства как у животных, так и у людей. Как показано в настоящем документе, при введении субъекту в дорсальном положении иммуногенной композиция, она может действовать как вакцина.

[00149] **Пример 4. Различия в иммуногенности при позиционном введении NasoVAX у новозеландских белых (NZW) кроликов**

[00150] **А. Получение моновалентного фармацевтического состава против вируса гриппа (NasoVAX)**

[00151] Дефектный по репликации аденовирусный вектор, содержащий и экспрессирующий антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, получали в соответствии с процедурой, подробно описанной в Lui J. et al. (A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system; Nat. Protoc. (2007) 2(5):1236-47). Аденовирусный вектор, использованный в этом исследовании (NasoVAX), представляет собой вектор с удаленными областями E1/E3, дефектный по репликации (RD)-Ad5, который экспрессирует представляющий интерес белок (например, HA гриппа) в клетках респираторного эпителия. В случае NasoVAX вектор содержит генетическую вставку, кодирующую поверхностный белковый антиген HA вируса гриппа типа А или В. В рекомбинантном векторе Ad5 отсутствует область E1 вирусного генома (нуклеотиды с 343 по 3511), что делает вирус дефектным по репликации (RD) и неспособным продуцировать инфекционные вирусные частицы при попадании в клетку-хозяина. Дополнительная делеция нуклеотидов в области E3 вектора удаляет гены, которые участвуют в уклонении от иммунного ответа хозяина и являются необязательными для репликации вируса. Экспрессионную кассету, состоящую из энхансера/промотора транскрипции цитомегаловируса для управления экспрессией HA гена, биоинженерного гена HA, и сигнала полиаденилирования вируса обезьяны 40, вставляли вместо последовательностей гена E1. На **фиг. 1** представлена схематическая диаграмма вектора RD-Ad5 и указаны те последовательности исходного генома аденовируса, которые

сохраняются в векторе. Для этого исследования вектор RD-Ad5 содержал генетическую вставку, кодирующую поверхностный белковый антиген гемагглютинин (HA) из A/California/04/2009(H1N1)-подобного штамма гриппа (AdcoCA09.HA). NasoVAX получали путем размножения вектора RD-Ad5 в клетках PER.C6, допускающих репликацию, с последующей очисткой вируса от урожая инфицированных клеток, а конечный продукт включал следующие вспомогательные вещества: трис-HCl (pH 7,4), гистидин, сахароза, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусная кислота и этанол. NasoVAX поставляли в одноразовых стеклянных флаконах, каждый из которых содержал номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), приготовленной в концентрации 2×10^{10} вирусных частиц/мл в буфере A195 (номер партии: 17143001), и использовали в исследованиях, приведенных ниже.

[00152] В. Иммунизация новозеландских белых (NZW) кроликов с использованием NasoVAX

[00153] Вирусные частицы NasoVAX (vp) вводили интраназально кроликам в жидкой форме с использованием приборов LMA MAD/MAD300 (описаны выше) или небулайзера AeroGen, при этом каждый кролик располагался в дорсальном положении (например, на спине) или в стернальном (например, в нормальном сидячем состоянии) положении. В дорсальном положении кролики располагались на спине с ноздрями, направленными вверх, в то время как в стернальном положении ноздри были направлены вниз, как при нормальном положении покоя, соответствующем нормальному положению сидя человека. Количество вирусных частиц (vp), введенных с использованием приборов LMA MAD/MAD300, составляло $7,5E7$ или $3E8$ вирусных частиц, при этом варьировали положение введения, как показано ниже (дорсальное или стернальное). Наряду с LMA MAD/MAD300 была контрольная группа, обработанная только буфером («буфер A195»). Также включали группу сравнения, которой закапывали (капли) NasoVAX в дорсальном положении. На **фиг. 9** показаны группы исследования (группы 1-5).

[00154] В случае иммуногенной композиции против вируса гриппа (например, вакцины) антитела, измеренные в анализе ингибирования гемагглютинации (HAI), являются суррогатом защиты, где HAI основан на способности антител, если они присутствуют в сыворотке, предотвращать агглютинацию между эритроцитами и вирусным гемагглютинином. В этих исследованиях иммуногенность NasoVAX оценивали с помощью HAI. Кратко, сыворотку испытуемых кроликов, которым вводили NasoVAX, тестировали с помощью HAI на наличие антител против вируса гриппа и сравнивали с

сывороткой контрольных кроликов, которым NasoVAX не вводили, при этом кролики находились в дорсальном или стернальном положении при введении, как указано. Результаты показаны в **Таблицах 1 и 2** ниже (НАИ в нулевой день равен нулю), а также на **фиг. 10-13**.

Таблица 1

Результаты НАИ на день 14

Группа	Положение	Доза (vр)	Животное №	НАИ
1	Дорсальное Лежачее положение	$7,5 \times 10^7$	1	10
			2	10
			3	5
			4	20
			5	10
			6	5
2	Стернальное	$7,5 \times 10^7$	7	5
			8	5
			9	10
			10	5
			11	5
			12	5
3	Дорсальное Лежачее положение	3×10^8	13	10
			14	80
			15	80
			16	5
			17	40
			18	20
4	Стернальное	3×10^8	19	5
			20	5
			21	5
			22	5
			23	10
			24	5

5	Дорсальное Лежачее положение	A195 буфер	25	5
			26	5
			27	5
			28	5
			29	5
			30	5

Таблица 2*Результаты НАИ на день 28*

Группа	Положение	Доза (vр)	Животное №	НАИ
1	Дорсальное	$7,5 \times 10^7$	1	5
			2	10
			3	5
			4	60
			5	20
			6	5
2	Стернальное	$7,5 \times 10^7$	7	5
			8	5
			9	5
			10	5
			11	5
			12	5
3	Дорсальное	3×10^8	13	80
			14	40
			15	40
			16	160
			17	40
			18	160
4	Стернальное	3×10^8	19	5
			20	5
			21	5
			22	5
			23	5

			24	5
5	Дорсальное лежачее положение	A195 буфер	25	5
			26	5
			27	5
			28	5
			29	5
			30	5

Таблица 3

Средний геометрический титр (GEOMEAN) и отношение средних геометрических (GMR) данных НАИ

	Введение	GEOMEAN	GMR
день 0	Дорсальное 7.5×10^7 vp	6.3	-
	Стернальное 7.5×10^7 vp	5	-
	Дорсальное 3×10^8 vp	5	-
	Стернальное 3×10^8 vp	5	-
	Дорсальное, плацебо	5	-
день 14	Дорсальное 7.5×10^7 vp	8.9	1.4
	Стернальное 7.5×10^7 vp	5.6	1
	Дорсальное 3×10^8 vp	25	5,0
	Стернальное 3×10^8 vp	5.6	1
	Дорсальное, плацебо	5	1
день 28	Дорсальное $7,5 \times 10^7$ vp	10.7	1.7
	Стернальное $7,5 \times 10^7$ vp	5	1
	Дорсальное 3×10^8 vp	71	14
	Стернальное 3×10^8 vp	5	1
	Дорсальное, плацебо	5	1

[00155] Данные, представленные в **Таблицах 1-3**, также представлены на **фиг. 10-13**. Как показано на **фиг. 10-13**, группа «Дорсальное 3×10^8 vp», в которой кроликам вводили 3×10^8 vp с помощью прибора LMA MAD/MAD300 в дорсальном положении,

показала, что эти кролики продуцировали антитела против вируса гриппа к 14 дню и что количество увеличивается ко 28 дню. Эти анализы НИА не показали, что какие-либо детектируемые антитела против вируса гриппа вырабатывались животными, которым вводили более низкую дозу (7.5×10^7) либо в дорсальном положении, либо в стернальном положении, или у животных, которым вводили более высокую дозу (3×10^8) в стернальном положении. Таким образом, это исследование неожиданно показало, что положение субъекта клинического исследования во время введения иммуногенных композиций, раскрытых в данном документе, такое, что ноздри направлены вверх (т.е. дорсальное положение), коррелировало с генерацией сильного иммуногенного ответа посредством интраназального введения иммуногенной композиции (например, вакцины)/терапевтического средства.

[00156] Пример 5. Двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование безопасности и иммуногенности NasoShield, вводимой в виде одной или двух доз в различных положениях дозирования

[00157] Это исследование представляло собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование Фазы 1b для оценки безопасности и иммуногенности NasoShield у здоровых взрослых в возрасте от 18 до 49 лет. Субъекты клинического исследования были обследованы в течение 28 дней до рандомизации (день 1). Приблизительно 42 субъекта клинических исследований, которые соответствовали всем критериям включения и не соответствовали критериям исключения и предоставившие письменное информационное согласие, были зарегистрированы и рандомизированы в три (3) параллельные группы, определяемые положением во время дозирования (обычное сидение, сидение с поднятыми над головой ноздрями или лежачее положение) и количеством доз (однократная доза в день 1 или 2 дозы в дни 1 и 29) для получения 0,5 мл интраназальных доз NasoShield (1×10^{11} vp) или плацебо в виде физиологического раствора. В каждой из следующих трех групп субъекты были рандомизированы слепым методом в соотношении 5:2 для получения 1: 1×10^{11} vp NasoShield или солевого плацебо в виде интраназального спрея: Группа 1: 1×10^{11} vp NasoShield или солевой раствор плацебо на день 1 и плацебо с физиологическим раствором на день 29 в обычном положении сидя (без периода выдержки после введения дозы), Группа 2: 1×10^{11} vp NasoShield или плацебо с физиологическим раствором на дни 1 и 29 в модифицированном положении сидя с поднятыми над головой ноздрями (т.е. ноздрями, направленными вверх) в течение 3 минут с последующим обычным сидячим положением в течение 27 минут, и Группа 3: 1×10^{11} vp NasoShield или плацебо с физиологическим

раствором в дни 1 и 29 в лежачем положении (на спине с направленными вверх ноздрями) в течение 30 минут. Субъекты в Группе 1, которые получили NasoShield в 1-й День, получили плацебо в 29-й День, а субъекты, получившие плацебо в 1-й День, также получили плацебо в 29-й День. Субъекты в Группе 2 и 3, которые получили NasoShield в день 1, получили NasoShield в день 29, а субъекты, которые получили физиологический раствор плацебо в день 1, получили физиологический раствор плацебо в день 29. Субъектов проинструктировали не сморкаться в течение 30 минут после введения дозы.

[00158] Группа 1: Обычное положение сидя. Субъекта поместили на стул в вертикальном положении, ноги на полу (Фото 1 ниже). Субъекта попросили держать голову прямо, а глаза сфокусировать прямо перед собой на объекте на уровне глаз. Субъекта попросили удерживать это положение, т.е. не наклонять голову назад или вперед во время дозирования. После завершения введения дозы дополнительный период выдержки не требуется. Субъекта должны были проинструктировать не сморкаться в течение 30 минут.

[00159] Группа 2: Положение сидя с приподнятыми над головой ноздрями. Субъекта поместили на стул, который позволил субъекту полностью вытянуть шею/наклонить голову назад, т.е. на стул с низкой спинкой. Субъекта попросили запрокинуть голову назад/поднять подбородок настолько, насколько это возможно, не сводя глаз с потолка. Субъекта попросили удерживать это положение, т.е. не наклоняться вперед/опускать подбородок и не двигать головой во время дозирования или в течение трех минут после дозирования. Если требовалось сохранить положение в течение трех минут, субъект мог держать полотенце за шейю для поддержки. Через три минуты субъект должен был вернуться в нормальное положение сидя и сохранять его в течение 27 минут. Субъекта должны были проинструктировать не сморкаться в течение 30 минут.

[00160] Группа 3: лежачее положение. Субъекта поместили в лежачее положение (лежа на спине) на плоской поверхности без подушки. Субъекта попросили держать голову прямо, сфокусировав взгляд прямо на потолке, прямо над головой. Субъекта попросили удерживать это положение, т.е. не сидеть и не поворачивать голову во время дозирования или в течение тридцати минут после введения дозы.

[00161] Основной целью данного исследования являлась оценка безопасности NasoShield, вводимой в виде интраназального спрея с 1×10^{11} вирусных частиц (vp), в зависимости от количества доз и положения дозирования. Эта основная цель была оценена путем определения: 1) Реактогенности: количества и процентной доли субъектов с локальными явлениями: раздражением носа, чиханием, заложенностью носа, носовым кровотечением, болью в горле, изменением обоняния, изменением вкуса, изменением зрения, болью в глазах через 7 дней после вакцинации, и 2) нежелательных явлений (АЕ):

количество и процент субъектов с нежелательными явлениями с 1-го по 57-й День, нежелательных явлений с медицинским обращением (МААЕ), серьезных нежелательных явлений (SAE) и новых возникших хронических заболеваний (NCI) с 1-го по 210-й День.

[00162] Первой вторичной целью данного исследования была оценка гуморальной иммуногенности NasoShield, вводимой в виде интраназального спрея с 1×10^{11} vp, в зависимости от количества доз и положения дозирования. Эта первая вторичная цель устанавливалась путем определения: 1) титра иммуноглобулина G (IgG) к протективному антигену (PA), измеряемого с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке путем определения среднего геометрического титра (GMT) (антилог среднего значения логарифмически преобразованных титров), отношения средних геометрических (GMR): отношение GMT после вакцинации и до вакцинации в группе с одной и той же дозой и коэффициентом респондентов, и 2) титров 50% фактора нейтрализации (NF50) и 50% эффективного разведения (ED50), измеренных с помощью анализа нейтрализации токсина (TNA) в сыворотке (GMT, GMR и коэффициент респондентов).

[00163] Второй вторичной целью данного исследования была оценка иммунного ответа слизистой оболочки на NasoShield, вводимой в виде интраназального спрея с 1×10^{11} vp, в зависимости от количества доз и положения дозирования. Эта вторая вторичная цель устанавливалась путем определения титра иммуноглобулина A (IgA) к протективному антигену PA, измеряемого с помощью ELISA (GMT GMR).

[00164] Третьей вторичной целью данного исследования была оценка влияния уровней антител к аденовирусу серологического типа 5 (Ad5) перед введением дозы на иммуногенность NasoShield в зависимости от количества доз и положения дозирования. Эта третья вторичная цель устанавливалась путем определения NF50 TNA иммуноглобулина G к протективному антигену PA и GMT и GMR иммуноглобулина A к протективному антигену PA на основе уровней антител к Ad5 перед вводимой дозой, измеренных с помощью микронеutralизации в сыворотке.

[00165] Четвертая вторичная цель данного исследования заключалась в измерении индукции иммунитета к Ad5 в зависимости от количества доз и положения дозирования. Эта четвертая вторичная цель устанавливалась путем определения GMT антител к Ad5, измеренного микронеutralизацией в сыворотке.

[00166] Субъекты проходили целевое и основанное на симптомах физическое обследование в разное время на протяжении всего испытания (например, для изучения любых нежелательных явлений (AE)). Образцы сыворотки для тестирования иммуногенности (измерение титра IgG к PA с помощью ELISA и измерение титра NF50 и

ED50 с помощью TNA) получали на дни 15, 29, 57, 91 и 210. Дополнительный образец сыворотки брали на дни 29 и 57 для измерения титра Ad5 с помощью анализа микронеутрализации. Мазки из носоглотки для выявления выделения дефектного по репликации Ad5 вектора с помощью количественного анализа полимеразной цепной реакции (qPCR) получали на дни 4, 8, 15, 36 и 57, а для выявления IgA к PA с помощью ELISA - на день 15, 36 и 57. Мазки не брали за 14 дней до введения дозы NasoShield/плацебо при посещениях в 1-й День или 29-й День. Проводили два промежуточных анализа данных об иммуногенности и безопасности (включая сводные данные о нежелательных явлениях (AE), реактогенности, сопутствующих лекарствах и вакцинах, основных показателях жизнедеятельности, ЭКГ и лабораторных данных, а также список результатов по любым вирусным культурам): в первый раз, когда были доступны все данные за день 29 посещения для всех субъектов, и второй, когда все данные за 57-й день посещения были доступны для всех субъектов.

[00167] Размер выборки для этого исследования выбирали как адекватный и разумный для обзора профиля безопасности и иммуногенности NasoShield, вводимой в виде интраназального спрея в разных положениях дозирования, а не для статистической достоверности. Размер выборки позволял произвести первоначальную оценку реактогенности. Учитывая в общей сложности 30 субъектов, получивших NasoShield, исследование имело 80% вероятность обнаружения по меньшей мере 1 нежелательного явления (AE), которое встречалось с частотой 5,2%. Если среди 30 субъектов, получивших NasoShield, не наблюдались серьезные нежелательные явления, приближение к односторонней верхней границе 95% доверительного интервала (CI) частоты возникновения серьезных нежелательных явлений (SAE) составляло 11,6%. Использовали следующие популяции для анализа: 1) Популяция Безопасности: все субъекты, давшие информационное согласие, рандомизировались и получали по меньшей мере 1 дозу исследуемого продукта (IP), 2) Оцениваемая Популяция: все субъекты из Безопасной Популяции, у которых есть результаты по IgG к PA на 1-й и 29-й День, и 3) Популяция согласно Протоколу (PP): все субъекты из Безопасной Популяции, получившие назначенную дозу испытуемого продукта в соответствии с протоколом, имели результаты по IgG к PA в дни 1, 15 и 29 и не имели серьезных отклонений от протокола, влияющих на первичные результаты иммуногенности, как это было определено организатором до блокировки базы данных. Первичные иммунологические анализы проводили с использованием Оцениваемой Популяции с анализом чувствительности на основе Популяции PP. Никаких приписываний отсутствующих данных не производили. Данные преобразовали соответствующим образом перед анализом. Исходный уровень определяли

как образец, собранный до введения исследуемого продукта в день 1. Основными переменными, представляющими интерес для оценки гуморального иммунного ответа на NasoShield, были титры IgG к PA, NF50 и ED50 TNA. Следующие показатели при 95% доверительном интервале суммировали по группам: GMT на исходном уровне и после вакцинации на дни 15, 29, 57, 91 и 210, GMR в дни 15, 29, 57, 91 и 210, и коэффициент респондентов в дни 15, 29, 57, 91 и 210. Реакции слизистых оболочек (IgA к PA) суммировали посредством среднего геометрического на исходном уровне и после вакцинации в дни 15, 36 и 57. Анализ влияния уровней антител к Ad5 в сыворотке до введения дозы на иммуногенность NasoShield в дни 29 и 57 проводили с использованием ковариационного анализа (ANCOVA) с исходным титром Ad5 в качестве ковариации. Анализ безопасности выполняли с использованием Популяции Безопасности. Количество (в процентах, при 95% CI) субъектов с локальными событиями и системными событиями суммировали по группам. События реактогенности суммировали по степени тяжести. Количество (в процентах, 95% CI) субъектов с нежелательными явлениями (AE) с 1-го по 57-й день (включая MAAE, NCI, SAE) суммировали для каждого класса системы органов Медицинского словаря регуляторной деятельности (MedDRA) и предпочтительного термина и по группам. Количество (процент) субъектов с MAAE, с NCI и с SAE с 1-го по 210-й день суммировали аналогичным образом. Также суммировали количество (в процентах, при 95% CI) субъектов с побочными эффектами по степени тяжести и по отношению к исследуемому продукту (IP). Сводная статистика по непрерывным параметрам (лабораторные анализы безопасности и основные показатели жизнедеятельности) были представлены по группам следующим образом: довакцинальная, поствакцинальная оценка и переход от довакцинальной к поствакцинальной оценке. Количество и процент субъектов с лабораторными показателями безопасности после вакцинации или показателями жизненно важных функций, зарегистрированными как новые отклонения от нормы (т.е. событие с повышением степени токсичности по сравнению с исходным значением и со степенью тяжести средней или более высокой) после вакцинации в исследовании, сводили в таблицу. Подготавливали таблицы сдвигов, в которых представлены перекрестные таблицы лабораторных значений безопасности до и после вакцинации для каждого субъекта по степени тяжести. Представляли сводные данные о количестве и проценте субъектов с нормальной, аномальной, не клинически значимой и аномальной, клинически значимой интерпретацией ЭКГ. При выделении дефектного по репликации вектора Ad5 данные суммировали по количеству и проценту положительных результатов по моменту времени, а также по среднему количеству копий. Медиану продолжительности выделения Ad5, вероятное отклонение, минимальную и максимальную

продолжительность выделения Ad5 определяли для каждой группы NasoShield и всех групп при дозировании NasoShield вместе взятых.

[00168] Конечные точки исследования могли включать информацию о безопасности, например, о том, что NasoShield безопасна для введения людям в любом из протестированных в данных исследованиях положений (например, обычное положение сидя, модифицированное сидячее положение и дорсальное положение/лежащее), и могли демонстрировать, что введение NasoShield в модифицированном положении сидя (Группа 2) приводило к гуморальной иммуногенности к РА (согласно первой вторичной цели) и иммунному ответу слизистой оболочки к РА (согласно второй вторичной цели), и что эти показатели превосходили Группу 2 по сравнению с Группами 1 (нормальное положение сидя) или 3 (лежащее положение). Уровни сывороточных антител Ad5, предшествующие введению дозы, в отношении иммуногенности NasoShield, могли быть признаны приемлемыми (согласно третьей вторичной цели), что означало, что это существенно не влияло на развитие иммунного ответа к РА, индуцированного NasoShield, особенно в Группе 2. Это испытание могло также показать, что индукция иммунитета к Ad5, вызванного NasoShield, если таковая имела, являлась приемлемой (согласно четвертой вторичной цели), что означало, что она существенно не влияла на развитие иммунного ответа к РА, индуцированного NasoShield, особенно в Группе 2.

[00169] Пример 6. NasoVAX при предотвращении клинического ухудшения у пациентов с коронавирусным инфекционным заболеванием 2019 ранней стадии (COVID-19)

[00170] В этом примере представили план клинического испытания для оценки эффективности дефектного по репликации аденовирусного вектора (с экспрессией трансгена (например, NasoVAX) или без (например, AdE) экспрессии трансгена) в предотвращении клинического ухудшения у пациентов с ранним COVID-19 (заболевание, вызванное SARS-CoV-2) в качестве основной задачи по исследованию эффективности. Вторичные цели исследования эффективности включали оценку влияния NasoVAX на тяжесть течения COVID-19, на что указывали изменения показателей сатурации (SpO₂) в покое и частоты пульса в покое и/или влияние NasoVAX на частоту госпитализаций, оксигенотерапии и искусственной вентиляции легких.

[00171] Первичная конечная точка эффективности могла включать долю пациентов с «клиническим ухудшением», которое определили в настоящем документе как 4,0% снижение от исходного уровня показателя сатурации SpO₂ в состоянии покоя по данным мобильной пульсовой оксиметрии при двух последовательных измерениях во

время домашнего наблюдения или госпитализации. Вторичные конечные точки эффективности могли быть определены путем измерения, например, без ограничений: 1) максимальной тяжести COVID-19 после лечения, оцениваемой по следующим измерениям: среднее снижение показателя сатурации SpO₂ в покое от исходного показателя сатурации SpO₂ в покое при скрининге в течение 14 дней домашнего наблюдения или госпитализации, среднее увеличение показателя частоты пульса в состоянии покоя от исходного уровня показателя частоты пульса в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней домашнего наблюдения или госпитализации, доли пациентов, нуждающихся в госпитализации на 42-й день, в зависимости от уровня необходимой кислородной поддержки (без кислородной поддержки, оксигенотерапия с помощью назальных канюль, оксигенотерапия с помощью устройства с высоким потоком или неинвазивная вентиляция легких и/или механическая вентиляция), и/или 2) общая летальность от всех причин до 42-го дня.

[00172] Основная цель безопасности данного исследования заключалась в оценке безопасности и переносимости NasoVAX у пациентов с ранней формой COVID-19. Конечные точки безопасности могли включать без ограничения частоту и тяжесть побочных эффектов, температуру в полости рта, использование жаропонижающих и бронхорасширяющих средств, продолжительность пребывания в стационаре и/или в отделении интенсивной терапии (ICU).

[00173] Приблизительно 96 пациентов с ранней формой COVID-19 были включены в исследование и рандомизированы 1:1 для NasoVAX или плацебо в три (3) последовательные когорты, определенные по возрасту и факторам риска тяжелого течения COVID-19. В Когорту 1 входили лица в возрасте 35-49 лет, факторы риска не учитывались. Когорта 2 включала лиц в возрасте 35 лет и старше, факторы риска не учитывались. Когорта 3 включала лиц в возрасте 35 лет и старше с допустимыми факторами риска. Каждая когорта включала примерно 20, 28 и 48 пациентов, соответственно, при этом пациенты были рандомизированы в соотношении 1:1 в группу NasoVAX или плацебо в каждой из когорт. Когорту 2 стратифицировали по возрастным группам 35–64 лет и 65 лет и старше, тогда как Когорту 3 стратифицировали по возрастным группам (возраст 35–64 года, возраст 65 лет и старше) и сопутствующим заболеваниям (присутствие одного или более факторов риска, факторы риска отсутствовали). В это исследование не включили пациентов, отвечавших одному или более из следующих критериев (которые могли быть факторами риска), выявленных на начальном этапе скрининга: беременные или кормящие женщины или планировавшие зачать ребенка в течение следующих трех (3) месяцев; частота дыхания в покое > 20 вдохов/мин на комнатном воздухе или частота пульса в покое > 125 ударов в минуту; быстро ухудшающееся течение, которое, по мнению лечащего врача, требовало

госпитализации в ближайшие 24-48 часов; любое хроническое заболевание легких, включая хроническую обструктивную болезнь легких и астму, или другие респираторные заболевания, которые могли обостриться независимо от COVID-19; тяжелое ожирение, определяемое как индекс массы тела > 40 кг/м²; история тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний, включая, помимо прочего, застойную сердечную недостаточность, ишемическую болезнь сердца, врожденный порок сердца, кардиомиопатию или легочную гипертензию, сахарный диабет, хроническое или текущее курение вейпов или сигарет, хроническое заболевание почек, требующее диализа, хроническое заболевание печени, включая, но не ограничиваясь этим, хронический вирусный гепатит, неалкогольный стеатогепатит или цирроз любой этиологии, нарушение уровня гемоглобина, включая серповидно-клеточную анемию и талассемию; история паралича Белла; заболевания носа, которые могли повлиять на пригодность интраназального лечения, такие как хронический ринит в анамнезе, дефект перегородки носа, расщелина неба, полипы носа или операции на носу, отличные от косметической ринопластики; использование гидроксихлорохина в течение последних 4 месяцев, хлорохина в течение последних девяти (9) месяцев или других исследуемых препаратов для лечения COVID-19 в течение последних 30 дней; история состояний, связанных с иммунодефицитом, включая, помимо прочего, плохо контролируемый ВИЧ, или методы лечения, которые, как известно, влияли на иммунную систему, включая, помимо прочего, пероральные или внутривенные кортикостероиды, алкилирующие препараты, антиметаболиты, цитотоксические препараты, облучение, иммуномодулирующие биологические препараты (включая IL-6, IL-12, ингибиторы или антагонисты Янус-киназы), и лечения рака в течение 30 дней после скрининга или предполагаемого использования в течение 6 месяцев после участия в этом исследовании; и/или любое медицинское, психиатрическое или социальное состояние, профессиональная или иная ответственность, которые, по мнению исследователя, могли помешать или служить противопоказанием к соблюдению протокола, оценке безопасности (включая реактогенность) или способности пациента дать информационное согласие; лечение гидроксихлорохином в течение 4 месяцев или хлорохином в течение 9 месяцев после скрининга; любое лечение, которое, как известно, влияло на иммунную систему, включая, помимо прочего, пероральные или внутривенные кортикостероиды, алкилирующие препараты, антиметаболиты, цитотоксические препараты, облучение, иммуномодулирующие биологические препараты, в течение 30 дней после скрининга; живые вакцины (например, живые вакцины против гриппа или живые вакцины для путешествий) в течение 30 дней после скрининга и в течение 14 дней после введения исследуемого препарата; и/или получение любого исследуемого препарата или лечения в

течение 30 дней после скрининга. Если пациента госпитализировали из-за COVID-19, ограничений в отношении сопутствующих лекарств нет. Каждый пациент участвовал в исследовании примерно до 4 недель (28 дней). Пациенты, которые остались госпитализированными по истечении 28 дней, наблюдались до 42-го дня, смерти или выписки, в зависимости от того, что наступило раньше.

[00174] NasoVAX представляет собой дефектный по репликации вектор аденовируса серологического типа 5 (RD-Ad5) с делецией E1/E3, который экспрессирует поверхностный антиген гемагглютинин (HA) A/California/04/2009 (H1N1)-подобного штамма гриппа посредством трансгенной вставки (исследуемый агент, изучаемый в соответствии с IND 21210; также известный как AdcoCA09.HA). См. **Пример 4а**. Иммуногенная композиция NasoVAX («лекарственный продукт») состоит из суспензии векторных частиц NasoVAX, поставляемых в виде замороженной суспензии в одноразовых дозированных флаконах, содержащих 0,7 мл лекарственного продукта в 2-мл флаконе из боросиликатного стекла USP Type 1. Замороженная суспензия предназначена для обеспечения номинальной дозы 1×10^{11} вирусных частиц (vp). 0,5 мл лекарственного препарата NasoVAX (размороженного до комнатной температуры, приблизительно 25 °C) вводили для доставки 0,25 мл интраназального спрея в каждую ноздрю в положении субъекта на спине с последующим 30-минутным периодом после введения дозы в лежачем положении, предпочтительно с последующим наблюдением в течение достаточного периода времени (например, два часа) после введения. Доза рассчитана на доставку приблизительно 1×10^{11} vp и вводится с помощью шприца Luer-lock объемом 1 (1) мл, снабженного назальным устройством для интраназального распыления на слизистую оболочку Teleflex LMA MAD300. Два делителя дозы по 0,1 мл прикреплены к поршню шприца, чтобы обеспечить разделенную дозу (т.е. половину дозы в каждую ноздрю, что означает, что стерильный распылитель Teleflex LMA MAD прикреплен к замку Luer для подачи 0,25 мл интраназального спрея в каждую ноздрю). В качестве плацебо коммерчески доступный 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций для интраназального введения готовили в шприцах, идентичных тем, которые используются для дозы NasoVAX, и вводили таким же образом, как и дозу NasoVAX.

[00175] Перед выпиской из исследовательского центра в первый день после введения лекарственного препарата или плацебо («день 1») пациентам предоставили: прибор, который располагается на кончике пальца, для пульсовой оксиметрии, подключаемый к планшету, которым обеспечили пациента для удаленного измерения SpO₂ в покое и частоту пульса в покое (пациенты обучены использованию устройства и планшета), цифровой термометр для измерения температуры в полости рта и инструкции

относительно того, как проводить вышеуказанные измерения, а также получать доступ и заполнять электронный дневник в Интернете (eDiary). После выписки на 1-й день пациенты возвращались домой на время исследования. Пациенты измеряли SpO₂ в состоянии покоя, частоту пульса в состоянии покоя и температуру в полости рта два раза в день в 09:00 и 16:00 часов с интервалом в один (1) час в каждый момент времени, и в любое время у них наблюдались ухудшающиеся симптомы COVID-19 до 14-го дня после введения лекарственного препарата или плацебо («14-й день») или госпитализации, в зависимости от того, что наступит раньше. Пациенты должны были ежедневно записывать симптомы, связанные с COVID-19, в течение этого же периода времени. Персонал исследовательского центра ежедневно связывался с пациентами по телефону в течение этого периода, чтобы документировать клиническое состояние пациента, записывать сопутствующие лекарства и отслеживать побочные эффекты. После 14-го дня персонал исследовательского центра связывался с пациентами по телефону приблизительно каждые 7±2 дня в течение 14 дополнительных дней, чтобы определить, были ли они госпитализированы, и следить за нежелательными явлениями, которые не завершились к 14-му дню. Если пациента госпитализировали в любое время, даты и время госпитализации/выписки, госпитализации/выписки из отделения интенсивной терапии и потребности в вентиляции легких записывались, если это было применимо. Пациенты, которые оставались госпитализированными по истечении 28 дней, наблюдались до 42-го дня, смерти или выписки, в зависимости от того, что наступало раньше.

[00176] В целях минимизации систематической ошибки в этом исследовании использовали несколько конструктивных особенностей, в том числе двойной слепой метод, при котором пациенты случайным образом назначались для получения NasoVAX или плацебо в соотношении 1:1. Случайное распределение пациентов позволяет избежать систематической ошибки и помогает обеспечить равномерное распределение как известных, так и неизвестных факторов риска между группами лечения. Использование плацебо-контроля позволяет проводить проспективное сравнение между группой активного лечения и контрольной группой. Чтобы снизить риск заражения SARS-CoV-2 в исследовательском центре и сократить использование средств индивидуальной защиты, все данные после введения исследуемого препарата собирали удаленно, либо в электронном виде, либо по телефону, никаких личных посещений после вакцинации не требовалось, если только у участника эксперимента не возникало изменений в симптомах или нежелательных явлениях, которые требовали визита для оценки. После введения исследуемого препарата в 1-й день пациентов оценивали дистанционно. Метод исследования соответствует

Руководству FDA по проведению клинических испытаний во время пандемии COVID-19 от марта 2020 г. (United States Food and Drug Administration 2020).

[00177] Статистические методы, используемые для изучения данных, полученных в этом клиническом испытании, включали предположения о мощности и размере выборки, которые специалисты в данной области техники считали достаточными. Размер выборки, выбранный для описанного выше исследования, считался достаточным для достижения целей исследования и был выбран без соображений статистической значимости. Для статистического анализа набор для анализа безопасности включал всех пациентов, получавших какой-либо препарат NasoVAX, популяция с модифицированным принципом лечения — это все рандомизированные пациенты, которые получали любое количество NasoVAX и имели исходное и по меньшей мере одно измерение SpO₂ в покое после базового уровня (пациентов анализировали в соответствии с лечением, которое они получали), и популяция в соответствии с Протоколом (PP) — это все рандомизированные пациенты, которые получали любое количество NasoVAX в соответствии с правильным назначением лечения и у которых 80% результатов измерений SpO₂ два раза в день в покое до 14-го дня или госпитализации. Исходный уровень определяли как данные, собранные ближе всего к рандомизации до введения любой дозы исследуемого препарата. Для SpO₂ в состоянии покоя и частоты пульса в состоянии покоя базовый уровень определяли как среднее значение двух измерений при скрининге. Все анализы и сводные статистические данные были представлены по группам лечения (NasoVAX или плацебо) внутри когорт, а также по группам лечения, объединенных по всем когортам. Описательная статистика, включая числа и проценты для категориальных переменных и чисел, средние значения, стандартные отклонения, медианы, минимумы и максимумы для непрерывных переменных, обеспечивались обработкой когорт. Пациентов рандомизировали в соотношении 1:1 в группу NasoVAX или плацебо и распределяли по Когортам 1, 2 или 3 (описано выше). Когорты зачисляли в порядке возрастания: Когорта 1 предшествовала Когорте 2, а Когорта 2 предшествовала Когорте 3. Когорта 2 была стратифицирована по возрастным группам 35–64 лет и 65 лет и старше, а Когорта 3 была стратифицирована по возрасту групп (возраст 35–64 года, возраст 65 лет и старше) и сопутствующим заболеваниям (присутствие одного или более факторов риска, отсутствие факторов риска). Пациенты в Когортах 2 и 3 были сначала стратифицированы, а затем рандомизированы 1:1 для NasoVAX или плацебо. Включение пациентов в возрасте 35-49 лет не должно превышать примерно 30% рандомизированной популяции в любой группе лечения. В анализе эффективности описательную статистику использовали для оценки различий между конечными точками исходной и постисходной эффективности. Для первичного

анализа доли пациентов с «клиническим ухудшением», определяемым как 4,0% снижение от исходного уровня среднего значения SpO₂ в покое при двух последовательных измерениях в течение 14 дней домашнего наблюдения или госпитализации, сравнивали между NasoVAX и плацебо группами с помощью критерия Кохрана-Мантеля-Хензеля при учете стратификации возрастных групп и факторов риска при одностороннем уровне значимости 0,025. Тот же подход применяли для вторичных или конечных исследовательских точек, которые носят категорический характер. Анализ чувствительности проводили для оценки влияния участка на реакцию на исследуемый препарат. Линейную и логистическую регрессию использовали для изучения влияния исходных факторов, таких как возраст, пол, лекарства и сопутствующие заболевания, на ответ. Изменения тяжести COVID-19 по сравнению с исходным уровнем оценивали по максимальному снижению показателя сатурации SpO₂ в покое или по увеличению частоты пульса в покое с помощью амбулаторной пульсовой оксиметрии и симптомам COVID-19 (eDiary) во время домашнего наблюдения и анализировали с использованием смешанной модели для повторных измерений. Модель включала в себя фиксированные эффекты взаимодействия лечения, недель и визитов по лечению, а также непрерывную ковариацию исходного уровня. В модели использовали неструктурированную ковариационную матрицу внутри пациента и ограниченный метод оценки максимального правдоподобия. Метод Каплана-Мейера применяли для сравнения изменений показателя сатурации SpO₂ в состоянии покоя между группами лечения с течением времени. С целью определения конечных точек эффективности исследования SpO₂ в покое и частоту пульса в покое оценивали только на основе наблюдаемых данных; если данные отсутствовали, то их не добавляли.

[00178] Дефектный по репликации аденовирусный вектор с экспрессией или без экспрессии антигенного трансгена (например, NasoVAX) может быть безопасным для введения людям с ранним COVID-19 в лежачем положении и эффективным для предотвращения клинического ухудшения у таких пациентов. Согласно определенным вариантам осуществления любой дефектный по репликации аденовирусный вектор (с экспрессией антигенного трансгена или без нее), вводимый интраназально, может быть использован в способах согласно настоящему изобретению для предотвращения ухудшения симптомов COVID во время ранней инфекции. Согласно определенным вариантам осуществления интраназальное введение дефектного по репликации аденовирусного вектора согласно настоящему изобретению, с или без экспрессии антигенного трансгена, быстро (например, в течение 24 часов или 1-2 дней после введения) вызывает общий ответ на вирусный патоген, что позволяет начать лечение до того, как

патоген будет идентифицирован или изучен. Согласно определенным другим вариантам осуществления интраназальное введение дефектного по репликации аденовирусного вектора согласно настоящему изобретению, экспрессирующего или не экспрессирующего антигенный трансген, применяют одновременно с противовирусными препаратами или профилактическими вакцинами. Защитные эффекты NasoVAX можно рассматривать как биологический ответ, модулирующий врожденный иммунитет, который ослабляет чрезмерный и патогенный иммунный ответ на респираторный патоген.

[00179] Несмотря на то, что некоторые варианты осуществления были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, понятно, что возможные вариации и модификации очевидны специалистам в данной области техники. Следовательно, предполагается, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные варианты, которые входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции, содержащей антиген патогена, субъекту-млекопитающему, где способ включает:

интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции,

где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении дозирования, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх,

посредством чего терапевтическая доза, введенная через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ,

где необязательно иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

2. Способ по п. 1, дополнительно предусматривающий инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять положение дозирования в течение периода выдержки после введения дозы, выбранного от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут.

3. Способ вакцинации человека против вирусной инфекции, включающий:

интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции человеку, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для человека, где в ходе интраназального введения человек находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри человека направлены вверх, и

инструктирование или иное предупреждение человека сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение приблизительно 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут или 30 минут после интраназального введения,

посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у человека.

4. Способ лечения вирусной инфекции у человека, включающий:

интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции человеку, где иммуногенная композиция содержит антиген патогена для человека, где в ходе интраназального введения человек находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри человека направлены вверх, и

инструктирование или иное предупреждение человека сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение приблизительно 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут или 30 минут после интраназального введения,

посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у человека.

5. Способ по любому предшествующему пункту, где ноздри субъекта-млекопитающего или человека находятся выше уровня головы субъекта-млекопитающего или человека.

6. Способ по любому предшествующему пункту, где менее приблизительно 20% терапевтической дозы покидают носовую полость в результате вытекания наружу.

7. Способ по любому предшествующему пункту, где иммуногенную композицию вводят в виде однократной дозы.

8. Способ по любому из пп. 1-6, где иммуногенную композицию вводят в виде разделенной дозы в каждую ноздрю.

9. Способ по п. 8, где разделенную дозу вводят с применением многодозового устройства интраназальной доставки.

10. Способ по любому предшествующему пункту, где иммуногенную композицию обеспечивают в виде первой дозы и бустерной дозы.

11. Способ по любому предшествующему пункту, где иммуногенную композицию обеспечивают в виде режима дозирования в комбинации с гетерогенной дозой в виде первой дозы или бустерной дозы.

12. Способ по любому предшествующему пункту, где иммуногенная композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор, который кодирует и экспрессирует гетерологичный антиген.

13. Способ по любому из пп. 1-11, где иммуногенная композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор без кодирования гетерологичного антигена.

14. Способ по любому предшествующему пункту, где иммуногенная композиция содержит нереплицирующийся аденовирусный вектор.

15. Способ по п. 14, где аденовирус представляет собой аденовирус человека.

16. Способ по п. 14, где аденовирус выбран из группы, состоящей из аденовируса крупного рогатого скота, собачьего аденовируса, аденовируса не относящихся к человеку приматов, куриного аденовируса или аденовируса свиней и поросят.

17. Способ по любому из пп. 14-16, где аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3.

18. Способ по любому предшествующему пункту, где эффективное количество выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3, и по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3.

19. Способ по любому предшествующему пункту, где субъекту-млекопитающему или человеку вводят интраназально иммуногенную композицию, содержащую эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего или человека.

20. Способ по любому предшествующему пункту, где патоген представляет собой респираторный патоген.

21. Способ по любому предшествующему пункту, где патоген представляет собой вирус.

22. Способ по п. 21, где вирус выбран из группы, состоящей из ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса и коронавируса.

23. Способ по п. 22, где коронавирус выбран из группы, состоящей из SARS-Cov, SARS-Cov-2, MERS, коронавирусов человека 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 и HKU1.

24. Способ по п. 21, где вирус выбран из группы, состоящей из вируса гриппа, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей и вируса кори.

25. Способ по п. 24, где вирусная инфекция верхних дыхательных путей представляет собой риновирус или коронавирус.

26. Способ по любому из пп. 1-20, где патогеном является бактерия.

27. Способ по п. 26, где бактерия выбрана из группы, состоящей из *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* и *Mycoplasma*.

28. Способ по п. 27, где бактерией является *Bacillus anthracis*.

29. Способ по п. 27 или 28, где антигеном является протективный антиген *Bacillus anthracis*.

30. Способ по п. 29, где протективный антиген *Bacillus anthracis* представляет собой PA83.

31. Способ по п. 27 или 28, где антигеном является фактор летальности *Bacillus anthracis*.

32. Способ по любому из пп. 1-20, где патогеном является грибок.

33. Способ по п. 32, где грибок представляет собой *Aspergillus*.

34. Способ по любому из пп. 1-22, где антигеном является антиген вируса гриппа, выбранный из группы, состоящей из антигена вируса сезонного гриппа, антигена вируса гриппа А, антигена вируса гриппа В.

35. Способ по любому из пп. 1-22 и 34, где антигеном является антиген поверхностный белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа или его фрагмент.

36. Способ по п. 34 или 35, где терапевтическая доза иммуногенной композиции содержит моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа, подходящий для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, причем иммуногенная композиция содержит:

эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ, предназначенный для обеспечения серологической защиты человека-субъекта с титром антител согласно анализу ингибирования гемагглютинации (НАИ) ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, и

фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

37. Способ по п. 36, где:

a) состав разработан для обеспечения серологической защиты субъекту-человеку с титром антител согласно НАИ ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, где необязательно титр антител согласно НАИ составляет по меньшей мере 50 и/или в течение 28 дней после введения,

b) эффективное количество составляет по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp),

c) состав не содержит адъювант,

d) антиген НА вируса гриппа происходит из вируса гриппа А, где необязательно вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1 и/или подтип H3N2,

e) способ вызывает серологически защитный иммунный ответ, длящийся в течение по меньшей мере 12 месяцев,

f) способ вызывает комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ и обеспечивает защиту против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В, и/или

g) иммунный ответ измеряют посредством анализа ингибирования гемагглютинации (НАИ).

38. Способ по любому из пп. 1-2 и 5-35, где субъектом-млекопитающим является домашнее животное, одомашненное животное, животное для производства пищи или корма, домашний скот, охотничье-промысловое животное, животное для скачек или спортивное животное.

39. Способ по любому из пп. 1-2 и 5-35, где субъектом-млекопитающим является корова, лошадь, кролик, собака, кошка, коза, овца или свинья.

40. Способ по любому из пп. 1-2 и 5-35, где субъектом-млекопитающим является человек или субъект-человек.

41. Способ введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора субъекту-млекопитающему, где способ предусматривает:

интраназальное введение субъекту-млекопитающему иммуногенной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, содержащего и экспрессирующего или не содержащего и не экспрессирующего гетерологичный антиген, кодон-оптимизированный для субъекта-млекопитающего,

где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении дозирования, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх,

посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ,

где необязательно иммуногенная композиция представляет собой вакцину.

42. Способ по п. 41, дополнительно включающий инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего сохранять положение дозирования в течение периода выдержки после введения дозы, выбранного от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут

43. Способ вакцинации человека против вирусной инфекции, включающий:

интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции человеку, где иммуногенная композиция содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного

вектора, дефектного по репликации, содержащего и экспрессирующего или не содержащего и не экспрессирующего гетерологичный антиген патогена для человека, где субъект в ходе введения находится в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении дозирования, при котором ноздри субъекта-млекопитающего направлены вверх, и

инструктирование или иное предупреждение человека сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение приблизительно 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут или 30 минут после интраназального введения,

посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у человека.

44. Способ лечения вирусной инфекции у человека, включающий:

интраназальное введение эффективного количества терапевтической дозы иммуногенной композиции человеку, где иммуногенная композиция содержит эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, кодирующего или не кодирующего гетерологичный антиген патогена для человека, где в ходе интраназального введения человек находится в модифицированном сидячем, полулежачем или лежачем положении, при котором ноздри человека направлены вверх, и

инструктирование или иное предупреждение человека сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение приблизительно 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут или 30 минут после интраназального введения,

посредством чего терапевтическая доза, введенная интраназально, вызывает защитный иммунный ответ у человека.

45. Способ по любому из пп. 41-44, где ноздри субъекта-млекопитающего или человека находятся выше уровня головы субъекта-млекопитающего или человека.

46. Способ по любому из пп. 41-45, где менее приблизительно 20% фармацевтической композиции покидают носовую полость в результате вытекания наружу.

47. Способ по любому из пп. 41-46, где иммуногенную композицию вводят в виде однократной дозы.

48. Способ по любому из пп. 41-46, где иммуногенную композицию вводят в виде разделенной дозы в каждую ноздрю.

49. Способ по п. 48, где разделенную дозу вводят с применением многодозового устройства интраназальной доставки.

50. Способ по любому из пп. 41-49, где иммуногенную композицию обеспечивают в виде первой дозы и бустерной дозы.

51. Способ по любому из пп. 41-49, где иммуногенную композицию обеспечивают в виде режима дозирования в комбинации с гетерогенной дозой в виде первой дозы или бустерной дозы.

52. Способ по любому из пп. 41-51, где защитный иммунный ответ индуцируется в течение приблизительно 24 часов.

53. Способ по любому из пп. 41-51, где защитный иммунный ответ индуцируется в течение приблизительно 1 или 2 дней.

54. Способ по любому из пп. 41-53, где аденовирусом является аденовирус человека.

55. Способ по любому из пп. 41-53, где аденовирус выбран из группы, состоящей из аденовируса крупного рогатого скота, собачьего аденовируса, аденовируса не относящихся к человеку приматов, куриного аденовируса или аденовируса свиней и поросят.

56. Способ по любому из пп. 41-55, где аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3.

57. Способ по любому из пп. 41-55, где эффективное количество выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3, по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3, и по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора с делецией или нарушением E1 и/или E3.

58. Способ по любому из пп. 41-57, где гетерологичный антиген происходит из респираторного патогена.

59. Способ по п. 58, где респираторный патоген представляет собой вирус.

60. Способ по п. 59, где вирус выбран из группы, состоящей из ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса и коронавируса.

61. Способ по п. 60, где коронавирус выбран из группы, состоящей из SARS-Cov, SARS-Cov-2, MERS, коронавируса человека 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 и HKU1.

62. Способ по п. 59, где вирус выбран из группы, состоящей из вируса гриппа, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей и вируса кори.

63. Способ по п. 62, где вирусная инфекция верхних дыхательных путей представляет собой риновирус или коронавирус.

64. Способ по п. 58, где респираторный патоген представляет собой бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus* и *Mycoplasma*.

65. Способ по п. 58, где респираторным патогеном является грибок, который необязательно представляет собой *Aspergillus*.

66. Способ по любому из пп. 41-58 и 64, где гетерологичный антиген представляет собой протективный антиген *Bacillus anthracis*, необязательно PA83, и/или фактор летальности *Bacillus anthracis*.

67. Способ по любому из пп. 41-60 и 62, где гетерологичный антиген представляет собой антиген вируса гриппа, необязательно поверхностный белок гемагглютинин (НА), и:

а) композиция разработана для обеспечения серологической защиты субъекту-млекопитающему с титром антител согласно НА1 ≥ 40 в течение 28 дней после введения против вируса гриппа, где необязательно титр антител согласно НА1 составляет по меньшей мере 50 и/или в течение 28 дней после введения,

б) эффективное количество составляет по меньшей мере 10^9 или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp),

с) композиция не содержит адьювант,

д) антиген НА вируса гриппа происходит из вируса гриппа А, где необязательно вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1 и/или подтип H3N2,

е) способ вызывает серологически защитный иммунный ответ, продолжающийся в течение по меньшей мере 12 месяцев, и/или,

ф) способ вызывает комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ, обеспечивает защиту против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В.

68. Способ по любому из пп. 41-42 и 45-67, где субъектом-млекопитающим является домашнее животное, одомашненное животное, животное для производства пищи или корма, домашний скот, охотничье-промысловое животное, животное для скачек или спортивное животное.

69. Способ по любому из пп. 41-42 и 45-68, где субъектом-млекопитающим является корова, лошадь, кролик, собака, кошка, коза, овца или свинья.

70. Способ по любому из пп. 41-42 и 45-67, где субъектом-млекопитающим или пациентом является человек.

71. Способ по любому из пп. 41-67 и 70, причем способ предусматривает интраназальное введение в ноздри субъекта-человека эффективного количества иммуногенной композиции, где в ходе введения ноздри субъекта-человека направлены

вверх, и эффективное количество вызывает защитный иммунный ответ против респираторного патогена.

72. Способ по п. 71, где эффективное количество содержит по меньшей мере приблизительно 10^9 вр.

73. Способ по п. 71 или 72, где иммуногенную композицию вводят в виде двух доз, разделенных приблизительно равным образом между двумя ноздрями субъекта-человека.

74. Способ по любому из пп. 71-73, где субъект-человек находится в лежачем положении в ходе введения и остается в лежачем положении в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут после введения.

75. Способ по любому из пп. 71-74, где гетерологичный антиген представляет собой антиген вируса гриппа, где необязательно антиген вируса гриппа представляет собой поверхностный антиген гемагглютинин (НА).

76. Способ по любому из пп. 71-74, где гетерологичный антиген представляет собой антиген коронавируса, где необязательно антиген коронавируса представляет собой антиген SARS-Cov-2.

77. Способ по любому из пп. 71-74, где аденовирусный вектор, дефектный по репликации, не содержит и не экспрессирует гетерологичный антиген.

78. Способ по любому из пп. 71-77, где субъектом-человеком является человек с коронавирусным инфекционным заболеванием начальной стадии.

79. Способ по п. 78, где способ предотвращает клиническое ухудшение у человека.

80. Способ по п. 79, где клиническое ухудшение представляет собой по меньшей мере приблизительно 4,0% снижение от исходного уровня показателя сатурации SpO_2 , как определено посредством пульсовой оксиметрии при двух последовательных измерениях после введения.

81. Способ по п. 79 или 80, где клиническое ухудшение определяют посредством измерения по меньшей мере одного показателя, выбранного из группы, состоящей из максимальной тяжести COVID-19 после лечения, как оценено посредством среднего снижения показателя сатурации SpO_2 в состоянии покоя от исходного уровня показателя сатурации SpO_2 в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней после введения, среднего увеличения показателя частоты пульса в состоянии покоя от исходного уровня показателя частоты пульса в состоянии покоя при скрининге в течение 14 дней после введения, доли пациентов, нуждающихся в госпитализации на день 42 после введения в соответствии с требуемым уровнем сатурации, и общей летальности до дня 42 после введения.

82. Способ по любому из пп. 71-81, где защитный иммунный ответ против респираторного патогена индуцируется в течение приблизительно 24 часов.

83. Способ по любому из пп. 71-81, где защитный иммунный ответ против респираторного патогена индуцируется в течение приблизительно 1 - 2 дней.

84. Способ по любому из пп. 1-83, где способ предусматривает инструктирование или иное предупреждение субъекта-млекопитающего или человека сохранять модифицированное сидячее, полулежачее или лежачее положение в течение 30 минут после интраназального введения.

85. Способ введения через слизистую оболочку терапевтической дозы иммуногенной композиции на основе нереплицирующегося вирусного вектора субъекту-человеку, где способ включает:

интраназальное введение субъекту-человеку иммуногенной композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) аденовирусного вектора, дефектного по репликации, содержащего и экспрессирующего или не содержащего и не экспрессирующего кодирующую последовательность гетерологичного антигена, кодон-оптимизированную для субъекта-человека,

где субъект-человек в ходе введения находится в модифицированном сидячем, полулежачем, лежачем или другом положении, при котором ноздри субъекта-человека направлены вверх,

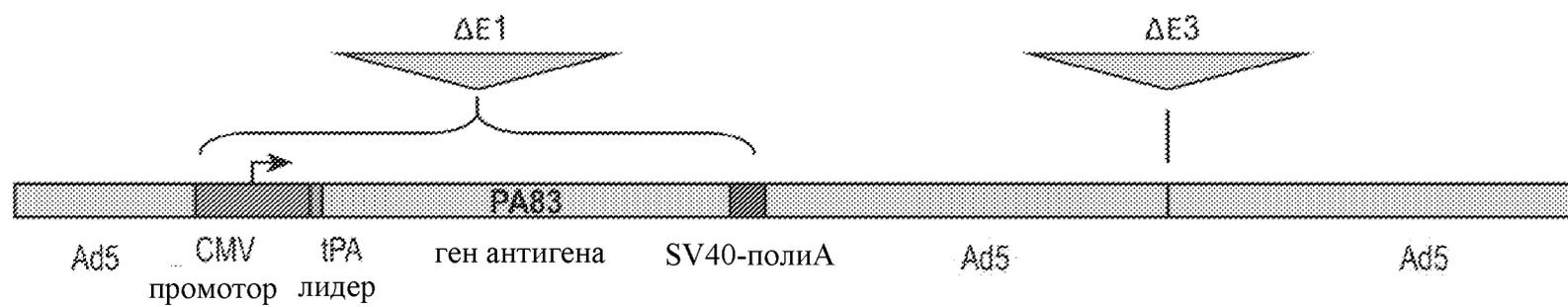
посредством чего терапевтическая доза, вводимая через слизистую оболочку, вызывает защитный иммунный ответ против респираторного патогена.

86. Способ по п. 85, где респираторный патоген выбран из группы, состоящей из ортомиксовируса, парамиксовируса, риновируса, коронавируса, вируса гриппа, синцитиального респираторного вируса (RSV), вирусной инфекции верхних дыхательных путей и вируса кори.

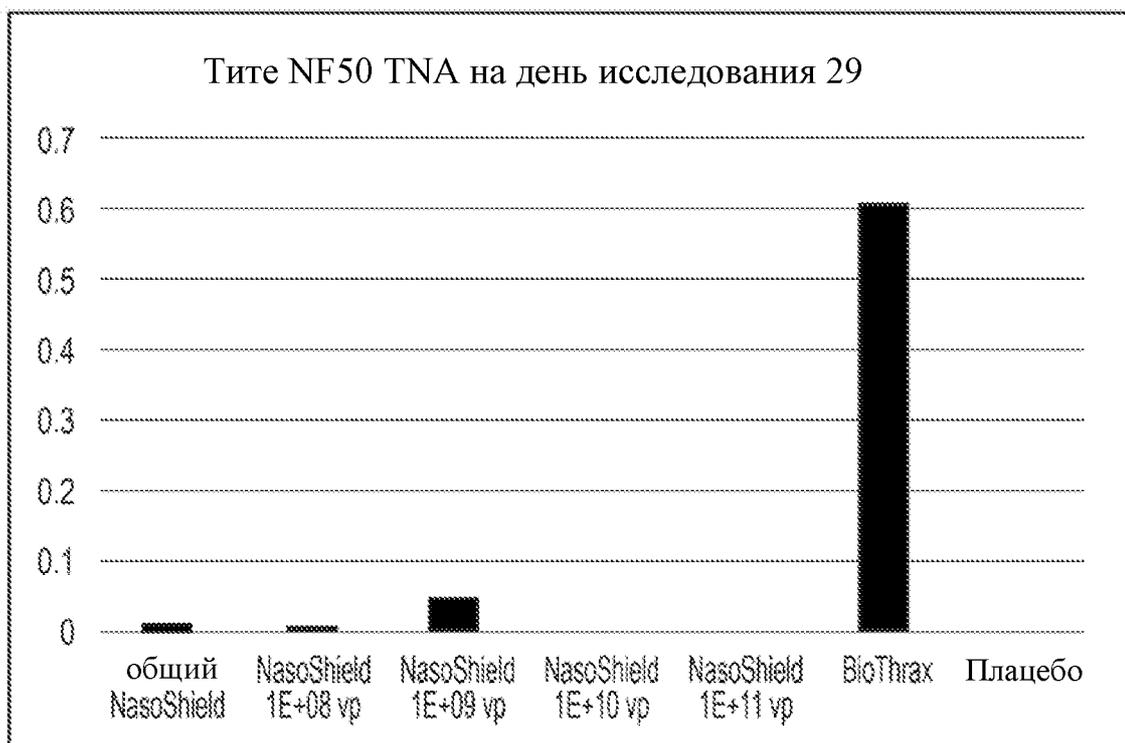
87. Способ по п. 85 или 86, где аденовирусный вектор, дефектный по репликации, содержит и экспрессирует гетерологичный антиген, выбранный из антигена вируса гриппа или антигена коронавируса.

88. Способ по любому из пп. 85-87, где гетерологичный антиген представляет собой антиген SARS-Cov-2.

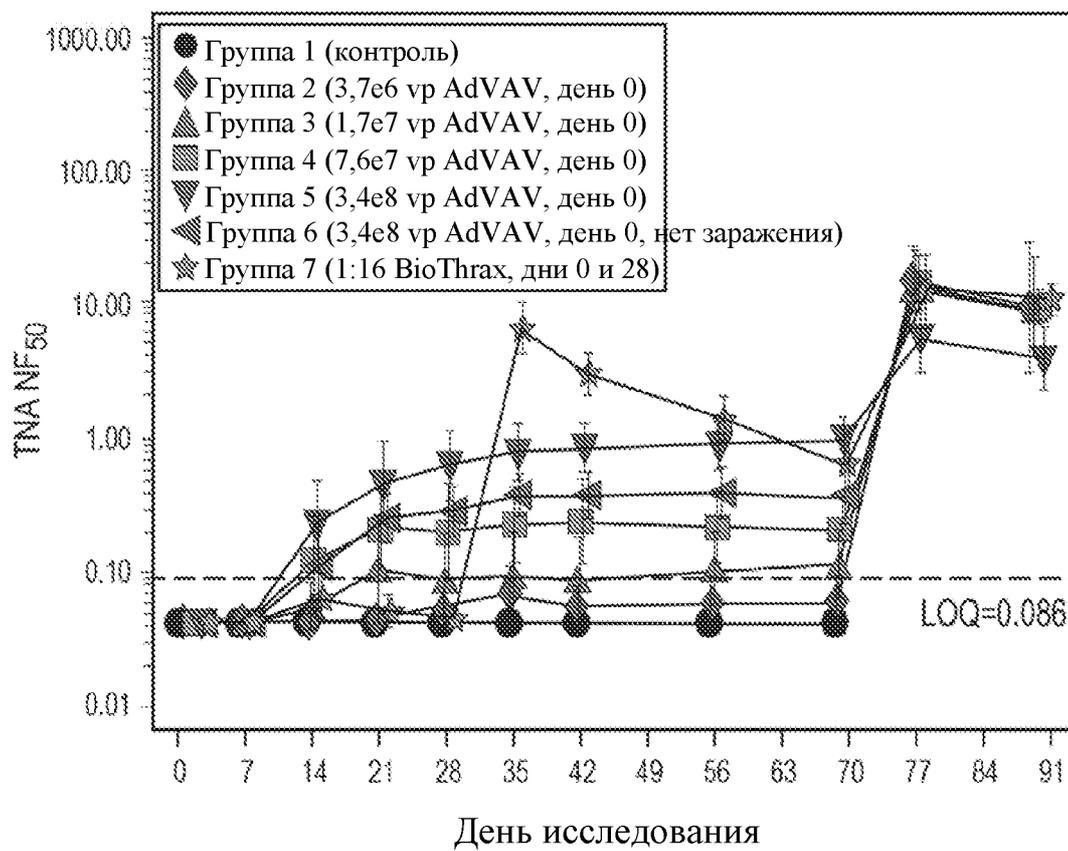
89. Способ по любому из пп. 85-87, где гетерологичный антиген представляет собой антиген вируса гриппа.



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3

группа	кролики на группу	продукт	вакцина доза/ разведение	способ введения	положение введения	день введения	объем введения	день заражения	день окончания исследования
1	24	NasoShield	3e7 vp	AeroGen	дорсальное положение лежачий	0	300 мкл 150 мкл на ноздрю	70	91
2	24	NasoShield	3e8 vp	AeroGen	дорсальное положение лежачий	0	300 мкл 150 мкл на ноздрю	70	91
3	24	NasoShield	3e8 vp	MAD300	стернальное положение лежачий	0	300 мкл 150 мкл на ноздрю	70	91
4	24	NasoShield	3e8 vp	MAD300	дорсальное положение лежачий	0	300 мкл 150 мкл на ноздрю	70	91
5	24	NasoShield	3e8 vp	IN	дорсальное положение лежачий	0	300 мкл 75 мкл x 4	70	91
6	10	буфер	NA	IN	дорсальное положение лежачий	0	300 мкл 75 мкл x 4	70	91

vp - вирусные частицы
IN - интраназальное

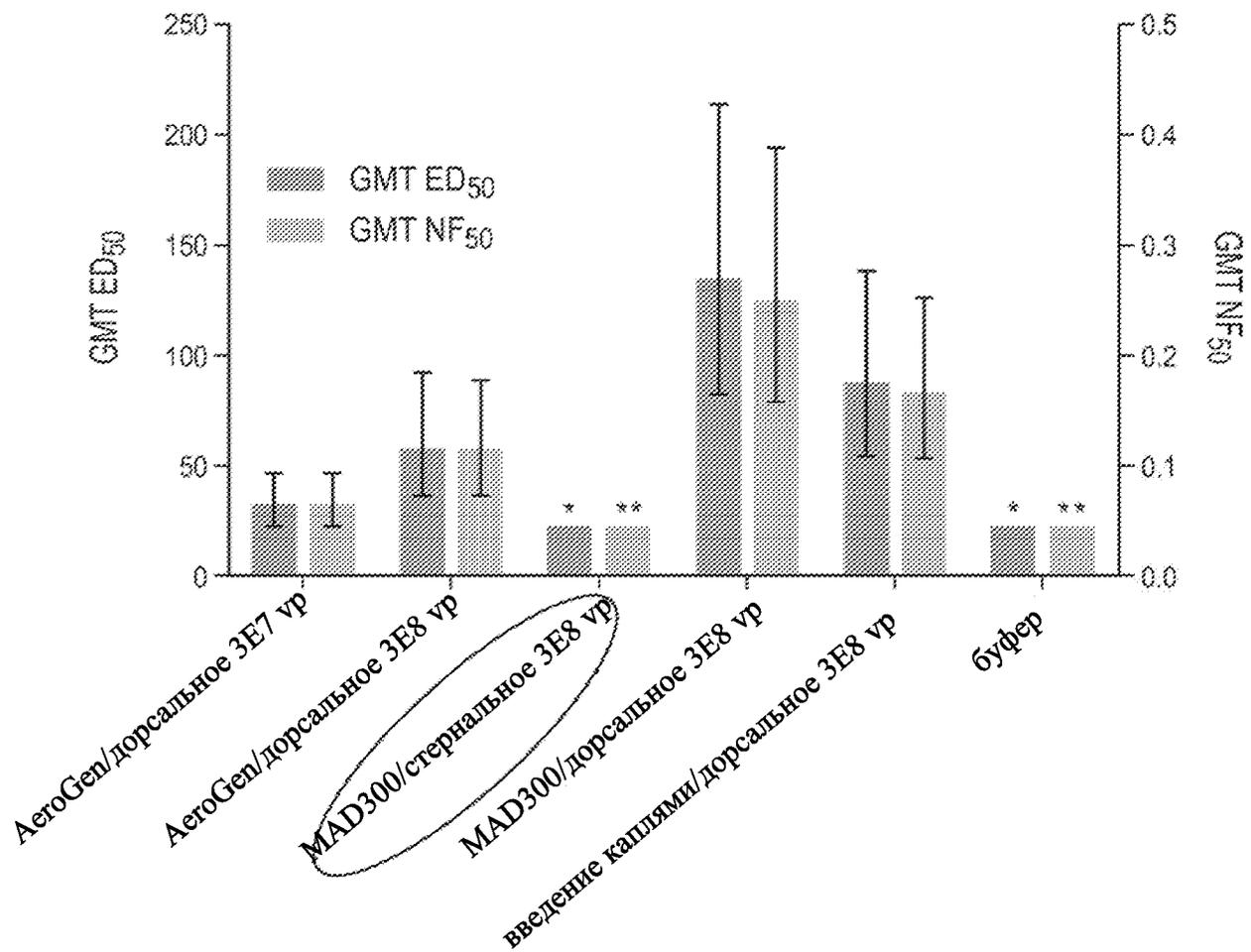
4/13

Фиг.4

группа	кролики на группу	продукт	вакцина доза/разведение	способ введения	положение введения	день 0 GMT	день 28 ED ₅₀ GMT	день 28 NF ₅₀ GMT
1	24	NasoShield	3e7 vp	AeroGen	дорсальное положение лежа	<LLOQ	40.81	0.068
2	24	NasoShield	3e8 vp	AeroGen	дорсальное положение лежа	<LLOQ	57.39	0.111
3	24	NasoShield	3e8 vp	MAD300	стернальное положение лежа	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
4	24	NasoShield	3e8 vp	MAD300	дорсальное положение лежа	<LLOQ	175.65	0.261
5	24	NasoShield	3e8 vp	IN	дорсальное положение лежа	<LLOQ	96.27	0.150
6	10	буфер	NA	IN	дорсальное положение лежа	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
ED ₅₀ LLOQ = 39 NF ₅₀ LLOQ = 0.086								

Фиг.5

Предварительные данные TNA на день 28

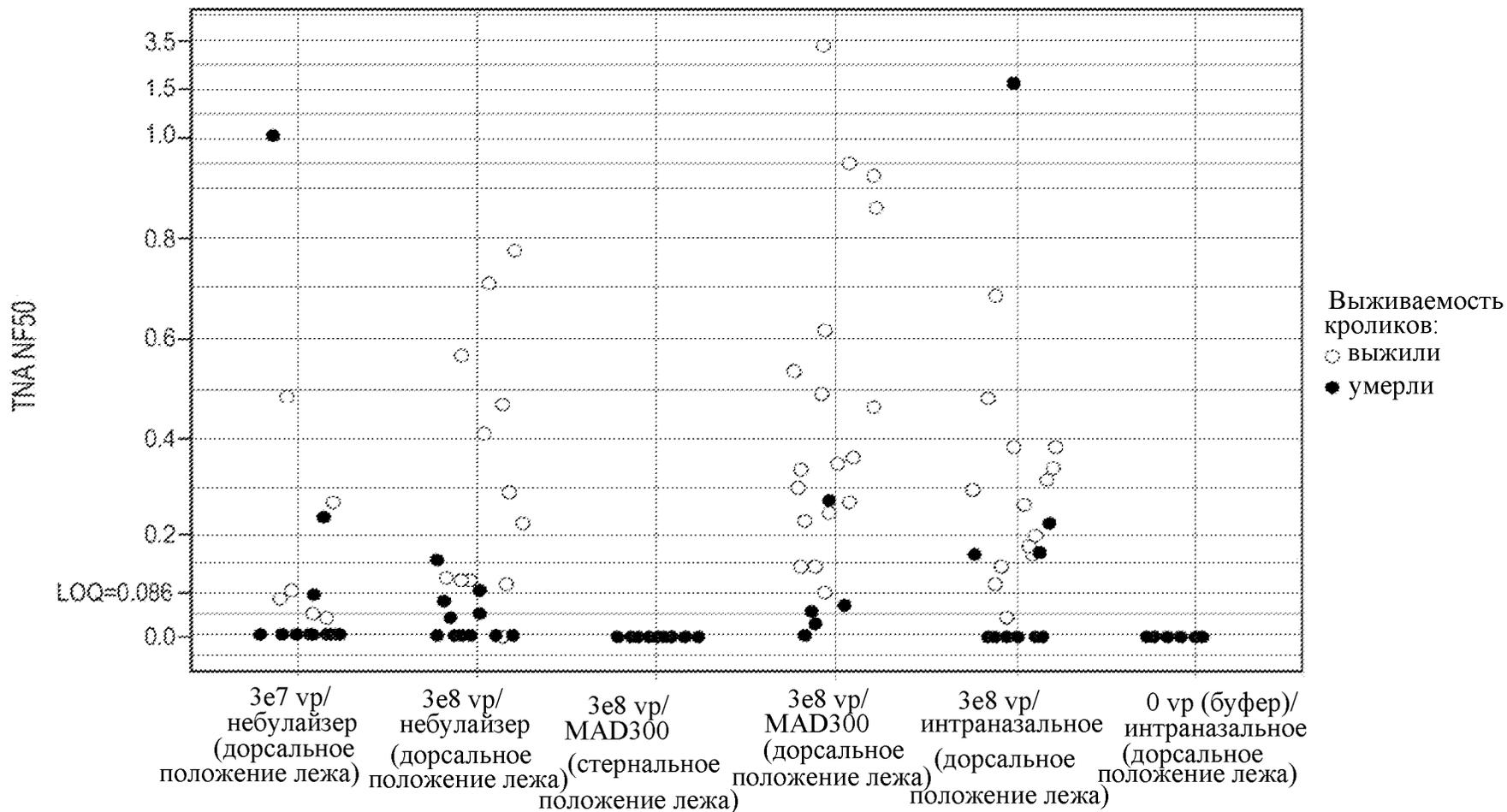


Фиг.6

Группа	Путь введения	Животные на группу	Смертность	Выживание
1	AeroGen/3e7 vp	24	71%	29%
2	AeroGen/3e8 vp	24	46%	54%
3	MAD300/стернальное/3e8 vp	24	100%	0%
4	MAD300/дорсальное/3e8 vp	24	21%	79%
5	введение каплями/дорсальное /3e8 vp	24	46%	54%
6	Буфер	10	100%	0%

Фиг.7

Данные по смертности кроликов



8/13

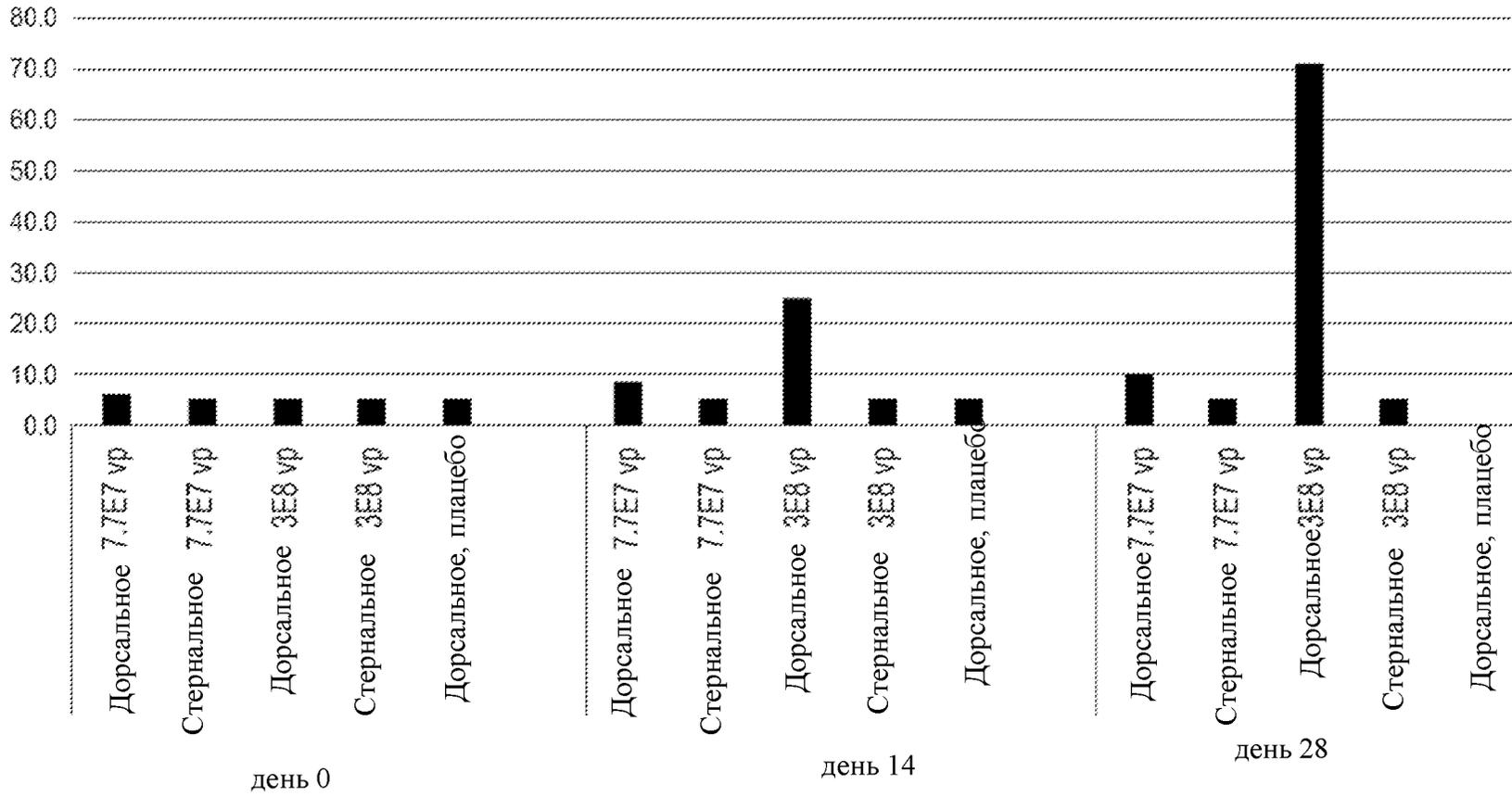
Фиг.8

Группа	N	Опрыскивание носа	Положение животного для дозирования на день 0	Используемое устройство	Доза	Объем на ноздрю
1 (тест 1)	6	день 28	дорсальное, лежа	MAD300небулайзер	7.5E7 vp	250 мкл на ноздрю с в общем 500 мкл
2 (тест 2)	6	день 28	стернальное	MAD300небулайзер	7.5E7 vp	250 мкл на ноздрю с в общем 500 мкл
3 (тест 3)	6	день 28	дорсальное, лежа	MAD300небулайзер	3E8vp	250 мкл на ноздрю с в общем 500 мкл
4 (тест 4)	6	день 28	стернальное	MAD300небулайзер	3E8vp	250 мкл на ноздрю с в общем 500 мкл
5 (плацебо)	6	день 0, 28	дорсальное, лежа	MAD300небулайзер	500 мкл	250 мкл на ноздрю с в общем 500 мкл

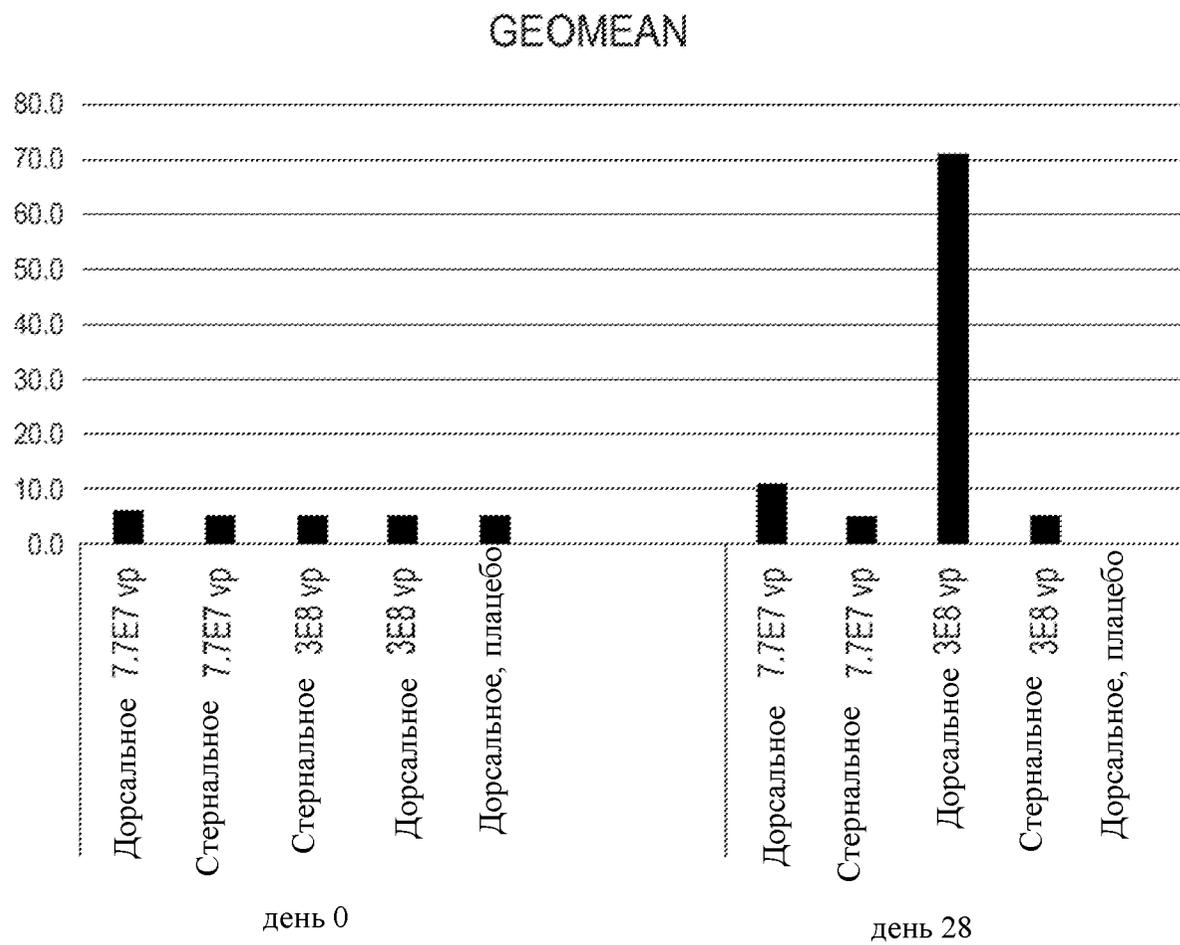
9/13

Фиг.9

GEOMEAN

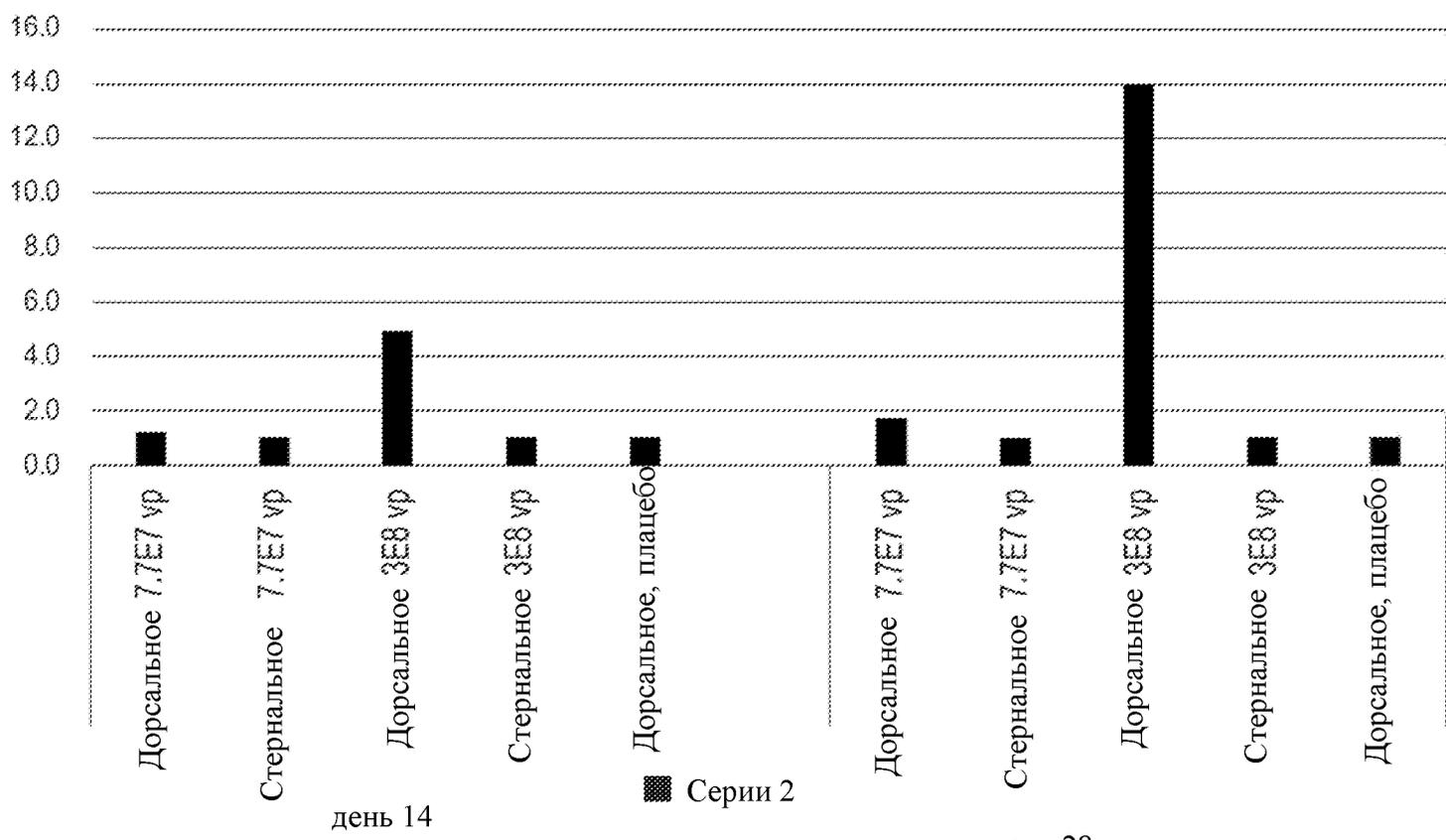


Фиг. 10



Фиг.11

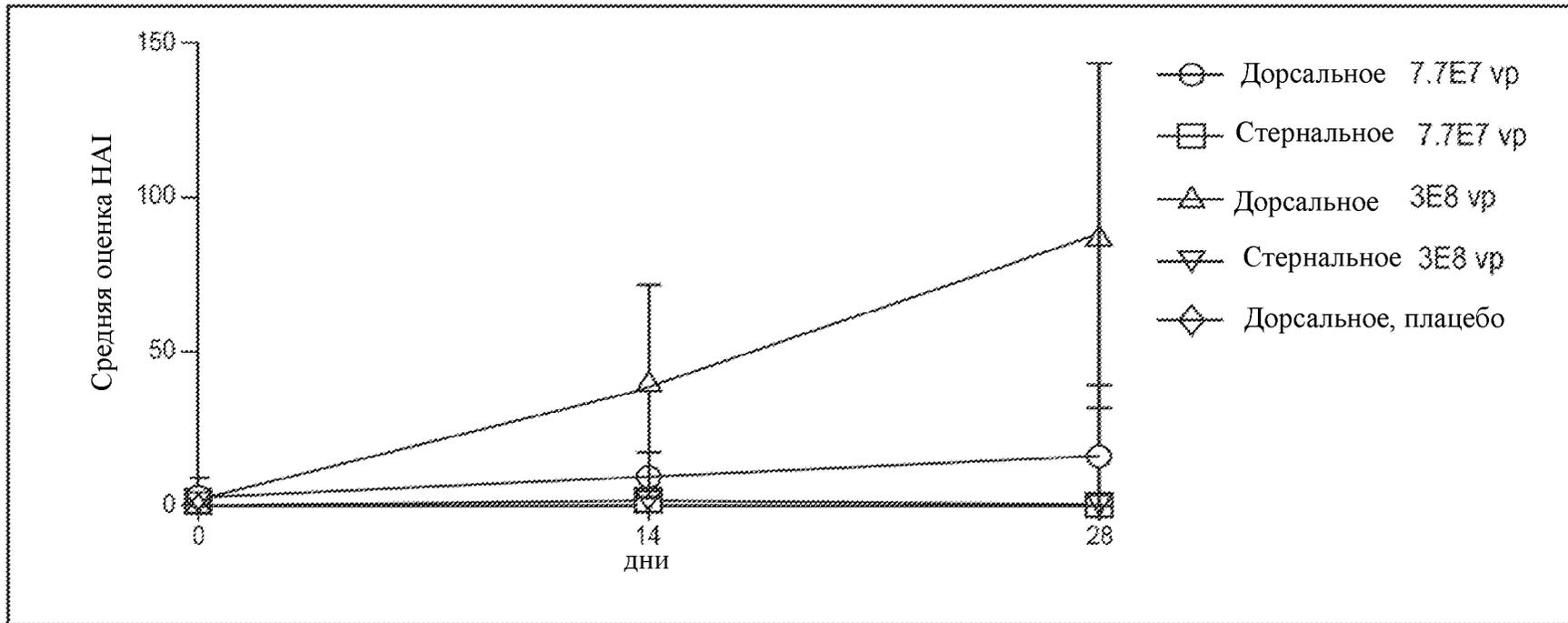
GMR



Фиг. 12

день 28

день 14



Фиг.13