(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290603 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.01

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(51) Int. Cl. ***C07K 14/195*** (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/255 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН

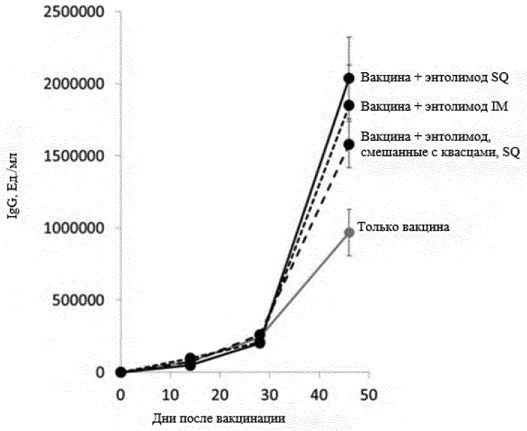
(31) **62/894,355**
(32) **2019.08.30**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/048425**
(87) **WO 2021/041822 2021.03.04**

(71) Заявитель:
ДЖИНОУМ ПРОТЕКШН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Гудков Андрей, Андрианова Екатерина (US)

(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н., Галухина Д.В. (RU)

(57) Изобретение частично относится к композициям и способам усиления иммунного ответа и повышения эффективности вакцины посредством стимуляции рецептора TLR5, например, рекомбинантным агонистом TLR5 (например, средством на основе флагеллина или его вариантом).



202290603 A1

202290603 A1

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] Настоящее изобретение относится к композициям и способам улучшения и/или повышения эффективности вакцин.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[002] Настоящая заявка испрашивает на преимущество и приоритет по предварительной заявке США № 62/894355, поданной 30 августа 2019 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[003] Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме: копия Перечня последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: GPI-004PC_ST25.txt; дата записи: 28 августа 2020 г.; размер файла: 63471 байт).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Вследствие старения иммунной системы, связанного со старением, вакцинация в популяции людей старческого возраста не была такой эффективной, как среди населения в целом. В Goodwin et al. *Vaccine* (2006) 24(8):1159-69 сообщается, что вакцина против гриппа характеризовалась только 17-53% клинической эффективности у людей пожилого возраста, тогда как, с другой стороны, клиническая эффективность у взрослых людей молодого возраста составляла 70-90%. Это является результатом неспособности вакцинации вызывать адекватный иммунный ответ у пожилых индивидуумов вследствие возрастных изменений как неспецифического (врожденного), так и специфического (адаптированного) иммунного ответа. В Weinburger et al. *Clin Infect Dis* (2008) 46(7):1078-84 обобщаются изменения ответа на вакцину в зависимости от возраста в виде повышения порога индукции ответа антител на вакцину. Более пожилые индивидуумы часто продуцируют недостаточные титры антител, необходимые для бустерной вакцинации. Этот неадекватный ответ антител может представлять опасность для жизни, особенно в стареющей популяции с другими сопутствующими заболеваниями. Нарушения их способности противостоять вирусу гриппа, наиболее распространенной причине инфекций пневмонии, приводило к госпитализации, повышению продолжительности пребывания в больнице и, по оценкам, к 10000-14000 смертей в Соединенных Штатах

Америки во время сезона гриппа 2015-2016 гг. в популяции в возрасте более 65 лет (Rolfes et al. *Influenza Other Respir Viruses*. (2018) 12(1):132-137).

[005] Ограничения существующих и разрабатываемых вакцин можно преодолеть посредством повышения начальных или бустерных титров антител, за счет чего повышаются титры антител выше порогового значения, необходимого для эффективности. В дополнение, вследствие общественного контроля и неоднозначности в отношении мнения о том, что наличие алюминия в вакцинах вызывает различные нарушения у реципиентов, предпочтительным является сокращение или отказ от применения алюминия в качестве адъюванта в вакцинах.

[006] Таким образом, необходимы терапевтические и/или профилактические меры для усиления иммунного ответа на различные раздражители в популяции людей старческого возраста вследствие увеличения продолжительности жизни и, следовательно, риска инфекции.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] Соответственно, в настоящем изобретении предложены, в определенных аспектах, способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента посредством введения указанному пациенту агониста TLR5, такого как энтолимод (*m.e* SEQ ID NO: 1) или его вариант, в комбинации с антигеном, который представляет собой составную частью инфекционного агента, выбранного из живого и аттенуированного, убитого, инактивированного и анатоксического инфекционного агента. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента среднего возраста или пациента старческого возраста. В дополнительных вариантах осуществления у пациента имеется стареющая иммунная система. В вариантах осуществления иммунный ответ пациента усиливается или стимулируется.

[008] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы стимуляции иммунного ответа на антиген у пациента, нуждающегося в этом, посредством введения указанному пациенту агониста TLR5, такого как энтолимод или его вариант. В вариантах осуществления иммунный ответ пациента усиливается или стимулируется.

[009] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены, в частности, способы предупреждения и/или снижения заболеваемости инфекциями вследствие пневмонии (*например,* гриппом) у пациента посредством введения агониста TLR5, такого как энтолимод или его вариант, в комбинации с вакциной указанному пациенту, при этом в некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента старческого

возраста. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой вакцину против вируса гриппа.

[0010] В различных вариантах осуществления пациент получает агонист TLR5, и иммунный ответ усиливается или стимулируется до введения пациенту антигена или вакцины.

[0011] В различных вариантах осуществления возраст пациента является средним (например, в возрасте от около 36 до 64 лет) или старческим (около 65 лет или больше). В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется стареющая иммунная система. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется нарушенная иммунная система. В дополнительных вариантах осуществления у пациента имеется ослабленный иммунитет.

[0012] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по усилению врожденных и/или адаптивных иммунных ответов у пациента. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению для улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента включают поддержание и/или увеличение популяции Т-клеток пациента (например, популяции CD4+ и/или CD8+ Т-клеток). В дополнительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают ослабление возрастного старения иммунной системы, как измеряется по повышению или восстановлению титров антигенспецифических антител пациента (например, IgG, IgM и IgA).

[0013] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, как измеряется по более высоким уровням титра антигенспецифических антител по сравнению с уровнями титра антигенспецифических антител у пациентов, которым не вводили агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по усилению врожденного иммунного ответа пациента по сравнению с врожденным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5. В дополнительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по усилению адаптивного иммунного ответа пациента по сравнению с адаптивным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления врожденный иммунный ответ и адаптивный иммунный ответ пациента усиливаются по

сравнению с врожденным и адаптивным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5.

[0014] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по увеличению и/или восстановлению популяции(ей) Т-клеток пациента по сравнению с популяциями Т-клеток пациента. которому не вводили агонист TLR5. Например, в дополнительных вариантах осуществления количество Т-клеток пациента, в том числе Т-клеток, выбранных из одной или нескольких CD4+ эффекторных Т-клеток, CD8+ эффекторных Т-клеток, CD4+ Т-клеток памяти, CD8+ Т-клеток памяти, CD4+ Т-клеток центральной памяти, CD8+ Т-клеток центральной памяти, естественных Т-клеток-киллеров, CD4+ клеток-хелперов (в том числе без ограничения Th1, Th2 и Th17) и CD8+ цитотоксических клеток повышается и/или восстанавливается по сравнению с популяциями Т-клеток пациента, которому не вводили агонист TLR5.

[0015] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по снижению дозы вакцины по сравнению с дозой вакцины у пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по снижению частоты введения вакцины по сравнению с частотой введения вакцины пациенту, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

[0016] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам повышения эффективности вакцины путем повышения и/или улучшения иммунного ответа на антиген. Например, антиген может представлять собой без ограничения целую клетку, вирус, белок, белковую субъединицу или фрагмент. В дополнительных вариантах осуществления антиген, который стимулирует иммунный ответ против нарушения, представляет собой составную часть инфекционного агента, выбранного из живого и аттенуированного, убитого, инактивированного и анатоксического инфекционного агента. В дополнительных вариантах осуществления антиген ассоциирован с опухолевой клеткой, клеткой с поврежденной ДНК или стареющей клеткой и/или стимулирует иммунный ответ против них. В частности, агонист TLR5 (например, средство на основе флагеллина), такой как энтолимод, можно применять в комбинации с вакциной против вирусного или патогенного агента, такой как вакцина против гриппа, пневмококковая вакцина или вакцина против ВИЧ. Более конкретно, агонист TLR5 можно применять, как описано в

данном документе, для усиления иммунного ответа на вакцину для любого штамма гриппа, такого как подтипы гриппа H1N1, H2N3 и B.

[0017] В вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается, что вакцинный адъювант, такой как квасцы, не вводят. В различных вариантах осуществления рекомбинантный или синтетический агонист TLR5 по настоящему изобретению вводят пациенту без геля или соли на основе алюминия, выбранных из гидроксида алюминия, фосфата алюминия и сульфата калия-алюминия, ASO4 (который состоит из соли алюминия и монофосфориллипида A (MPL)), AS03 (α-токоферол, сквален и полисорбат 80 в эмульсии масло-в-воде) и ALHYDROGEL.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0018] Вышеупомянутые особенности вариантов осуществления будут более понятны при обращении к нижеследующему подробному описанию со ссылкой на прилагаемые графические материалы, на которых:

[0019] **На Фиг. 1** изображена схематическая иллюстрация временной шкалы исследования иммунизации с совместным введением энтолимода или без него (SEQ ID NO: 1). Иммунизация, сбор сыворотки крови и временные точки умерщвления/сбора образцов показаны для групп самцов мышей NIH Swiss, получавших вакцину Prevnar13 с энтолимодом или без него.

[0020] На **Фиг. 2** изображены уровни титров антител IgG, специфичных для пневмококка/Prevnar13 (левые панели) и IgM (правые панели), измеренные посредством ELISA в образцах сыворотки крови, собранных в день 12 или день 27 после иммунизации в день 1 (с бустерной иммунизацией, проведенной в день 15). Показаны средние титры антител. * указывает на статистически значимые различия, определенные с помощью t-критерия Стьюдента. Все другие сравнения между сопоставимыми группами, обработанными PBS и обработанными энталимодом, были статистически незначимыми (P>0,3). Для панелей титра антител IgM в каждом наборе из двух гистограмм левая полоса представляет собой измерение до бустерной вакцинации, а правая полоса представляет измерение после бустерной вакцинации.

[0021] **На Фиг. 3** изображен процент лимфатических клеток в суспензии отдельных клеток всех клеток селезенки мышей в возрасте 113 недель на момент совместного введения Prevnar13 и энтолимода (в дозах 0,1 мкг/мышь и 1,0 мкг/мышь) или PBS.

[0022] **На Фиг. 4A и Фиг. 4B** изображены как процентное содержание (Фиг. 4A), так и общее количество (Фиг. 4B) лимфатических клеток в суспензии отдельных клеток из

клеток селезенки мышей, возраст которых составлял 73 недели во время совместного введения Prevnar13 и энтолимода (в дозе 0,1 мкг/мышь и 1,0 мкг/мышь) или PBS.

[0023] **На Фиг. 5A, Фиг. 5B, Фиг. 5C, Фиг. 5D** и **Фиг. 5E** изображены проценты и количество различных Т-клеточных маркеров (например, CD8-, CD4+ и CD44+) в суспензии отдельных клеток из клеток селезенки мышей, возраст которых составлял 30 недель во время совместного введения Prevnar13 и энтолимода (в дозе 0,1 мкг/мышь и 1,0 мкг/мышь) или PBS.

[0024] **На Фиг. 6** изображена схематическая иллюстрация графика иммунизации мышей, иммунизированных Tdap с энтолимодом и без него. Мышей иммунизировали в день 1 эксперимента и выполняли бустерную иммунизацию в день 32. Образцы сыворотки крови собирали в день 0 (исходный уровень), день 14, день 28 и день 46.

[0025] **На Фиг. 7** изображены результаты исследования совместного введения энтолимода с вакциной Tdap при различных путях введения и в разных составах для определения того, повысилась ли эффективность вакцинации, посредством измерения уровней специфических столбнячных IgG в сыворотке крови. Показаны средние титры антител.

[0026] **На Фиг. 8** изображены повышенные показатели титра IgG после бустерной вакцинации в группах введения вакцины +3 дня и +7 дней по сравнению с контрольными группами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0027] Настоящее изобретение частично относится к композициям и способам усиления иммунного ответа и/или повышения эффективности вакцины у пациента посредством стимуляции рецептора TLR5, например, рекомбинантным или синтетическим агонистом TLR5 (*например*, средством на основе флагеллина или его вариантом). В различных вариантах осуществления у пациента имеется стареющая иммунная система и/или ослабленный иммунитет. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента старческого возраста.

[0028] Некоторые из аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения основаны, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что агонисты TLR5 (*например*, рекомбинантный или синтетический флагеллин и/или средства на основе флагеллина, такие как энтолимод) могут быть эффективными, например, в улучшении и/или повышении эффективности вакцины в различных популяций пациентов, в том числе без ограничения пациентов старческого возраста.

[0029] Не ограничиваясь какой-либо теорией, в настоящем изобретении предполагается, что иммунный ответ на антиген может быть улучшен и/или усилен посредством активации механизма естественного врожденного иммунитета в ответ на инфекцию, вызванную бактериями, имеющими жгутики, органеллу для активного передвижения, которая построена из белка флагеллина; присутствие таких бактерий в организме распознается рецептором клеточной поверхности, называемым Toll-подобным рецептором 5 (TLR5). Связывание агониста TLR5, например, флагеллина или средства на основе флагеллина (например, энтолимода) с TLR5, запускает физиологический ответ, ведущий к системной мобилизации иммунной системы, сопровождающейся выработкой множества биологически активных факторов (цитокинов, хемокинов и т.д.), которые оказывают длительный эффект на организм, проявляющийся в замедлении развития старческой астении и улучшении здоровья и качества жизни получивших лечение организмов. Лечение флагеллином или его производными, способными активировать TLR5, может рассматриваться как подход к усилению и/или улучшению эффективности вакцины или к ослаблению последствий возрастного старения иммунной системы.

Старение иммунной системы

[0030] Как описано в данном документе, старение иммунной системы относится к возрастному снижению иммунологической компетентности в результате прогрессивного ухудшения врожденных (например, нейтрофилов, макрофагов и NK-клеток) и адаптивных (дендритных клеток и Т-клеток) иммунных ответов.

[0031] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения старения иммунной системы у субъекта посредством введения субъекту количества агониста TLR5 (например, средства на основе флагеллина), такого как энтолимод, эффективного для усиления иммунного ответа на антиген (например, вакцинный антиген) так, чтобы были достигнуты защитные титры антител или Т-клеточный ответ на антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген, предусмотренный настоящим изобретением, ассоциирован с иммунитетом против одного или нескольких из клетки, содержащих поврежденную ДНК, и стареющей клетки, и/или стимулирует его.

[0032] В настоящем изобретении в некоторых вариантах осуществления предложены способы введения субъекту некоторого количества агониста TLR5 (например, средства на основе флагеллина), такого как энтолимод, для стимуляции и мобилизации врожденного и адаптивного иммунитета. Например, в некоторых вариантах осуществления агонист TLR5 индуцирует изменения пропорций и распределения в тканях, а также активацию клеточных компонентов врожденного иммунитета (нейтрофилов, макрофагов и NK-

клеток) в солидных тканях (например, печени, легких, мочевом пузыре) с последующей мобилизацией адаптивного иммунитета (дендритные и Т-клетки).

[0033] В некоторых вариантах осуществления пациент страдает хроническим заболеванием, приводящим к нарушению иммунной функции или ослаблению иммунитета, например, пациент с диабетом, в том числе сахарным диабетом, пациент с хронической обструктивной болезнью легких (COPD) или пациент с серповидно-клеточной анемией.

[0034] В некоторых вариантах осуществления старение иммунной системы представляет собой снижение иммунной функции, приводящее к нарушению иммунного ответа, *например*, на рак, вакцинацию, инфекционные патогены, среди прочего. Он включает в себя как способность хозяина отвечать на инфекции, так и развитие долговременной иммунной памяти, особенно при вакцинации. Этот иммунный дефицит встречается повсеместно и обнаруживается как у долгоживущих, так и у короткоживущих видов в зависимости от их возраста относительно продолжительности жизни, а не от хронологического времени. Он считается основным фактором, способствующим увеличению частоты заболеваемости и смертности среди людей пожилого и старческого возраста. Старение иммунной системы не является случайным разрушительным явлением, скорее, оно, по-видимому, обратно повторяет эволюционный паттерн, и большинство параметров, на которые влияет старение иммунной системы, по-видимому, находятся под генетическим контролем. Старение иммунной системы также можно рассматривать как результат постоянного воздействия неизбежного воздействия различных антигенов, таких как вирусы и бактерии. Старение иммунной системы представляет собой многофакторное состояние, приводящее ко многим патологически значимым проблемам со здоровьем, например, у населения пожилого возраста. Возрастные биологические изменения, такие как деплеция гемопоэтических стволовых клеток, повышения количества PD1+ лимфоцитов, снижение общего количества фагоцитов и NK-клеток и снижение гуморального иммунитета, способствуют возникновению старения иммунной системы. В одном аспекте старение иммунной системы можно измерить у индивидуума посредством измерения длины теломер в иммунных клетках (см., например, патент США № 5741677). Старение иммунной системы также можно определить посредством описания у индивидуума более низкого, чем обычно, количества наивных CD4 и/или CD8 Т-клеток, репертуара Т-клеток, количества PD1-экспрессирующих Т-клеток, например, более низкого, чем обычно,

количества PD-1 отрицательных Т-клеток, или ответа на вакцинацию у субъекта старше 65 лет.

[0035] В некоторых вариантах осуществления нарушенный иммунный ответ представляет собой состояние, при котором у субъекта отсутствует надлежащий иммунный ответ, например, на рак, вакцинацию, инфекцию вследствие патогенов и другие. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что субъект с нарушенным иммунным ответом не получит уровней титра защитных антител после профилактической вакцинации или у субъекта не будет снижения бремени заболевания после терапевтической вакцинации. У субъекта также может быть нарушенный иммунный ответ, если субъект представляет собой члена популяции, о которой известно, что она характеризуется сниженной иммунной функцией, или которая характеризуется историей сниженной иммунной функции, например, люди пожилого возраста, субъекты, проходящие химиотерапевтическое лечение, аспленические субъекты, субъекты с ослабленным иммунитетом или субъекты с ВИЧ/СПИДом. В некоторых вариантах осуществления у субъекта (например, субъекта пожилого возраста) имеется нарушенный иммунный ответ вследствие полипрагмазии или введения множества различных лекарственных средств и/или терапевтических средств, которые подавляют иммунный ответ субъекта. Способы, описанные в данном документе, позволяют осуществлять лечение нарушенного иммунного ответа посредством введения иммуностимулирующей дозы агониста TLR5, например, средства на основе флагеллина, такого как энтолимод.

[0036] В некоторых вариантах осуществления старение иммунной системы включает снижение иммунного ответа на инфекцию с возрастом и является результатом инволюции тимуса в линиях Т-клеток, что приводит к снижению продуцирования и экспорта Т-клеток (см., например, Shimatani, K et al. (2009) PNAS 106 (37):15807-15812). В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение популяции в виде полноценной возрастной популяции CD4+ Т-клеток, определяемой конститутивной экспрессией PD-1, которая индуцируется только временно при активации в регуляторных Т-клетках и, следовательно, снижается иммунный ответ на инфекцию (см., например, Shimatani, K et al. (2009) PNAS 106 (37):15807-15812). В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение популяции CD8+ Т-клеток, определяемое повышенной экспрессией PD-1 при опосредованной рецептором активации CD8+ Т-клеток (см., например, Nunes, C et al. (2012) Clinical Cancer Research 18(3):678-687). В некоторых вариантах осуществления старение иммунной системы включает клеточное старение, при котором клетка больше не делится. В некоторых вариантах осуществления возрастное старение иммунитета

включает снижение продуцирования наивных лимфоцитов гемопоэтическими стволовыми клетками (Chen, Science Signaling, ra75, 2009). Клеточное старение коррелирует с прогрессирующим укорочением теломер, которое происходит при каждом клеточном делении.

Агонисты TLR5 и их производные

[0037] Toll-подобные рецепторы (TLR) играют центральную роль в инициации клеточных врожденных иммунных ответов. Они распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), которые экспрессируются на инфекционных агентах, и опосредуют продуцирование цитокинов, необходимых для развития эффективного иммунитета. Существуют 10 генов TLR у людей и 12 у мышей. В частности, Toll-подобный рецептор 5 (TLR5) представляет собой трансмембранный белок, который распознает бактериальный флагеллин и высоко экспрессируется в слизистой оболочке кишечника. Позвоночные организмы распознают присутствие потенциально патогенных бактерий, несущих жгутики, посредством передачи сигналов, активируемых высокоспецифическим взаимодействием флагеллина с TLR5, которое запускает каскад событий сигнальной трансдукции, направленных на активацию и мобилизацию естественных защитных механизмов врожденного иммунитета. Активация TLR5 энтолимодом (CBLB502), фармакологически применимым производным флагеллина, была способна защитить животных от смертельного облучения всего тела.

[0038] В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5 избирательно активирует или усиливает нормальную передачу сигнала через TLR5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист TLR5 является рекомбинантным или синтетическим. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5 характеризуется EC50, составляющей менее около 10^{-7} M; или менее 10^{-8} M; или менее 10^{-9} M; или менее 10^{-10} M; или менее 10^{-10} M; или менее 10^{-11} M. В определенных вариантах осуществления агонист TLR5, как предложено в данном документе, характеризуется EC50, составляющей менее около 10^{-7} M; или менее 10^{-8} M; или менее 10^{-9} M; или менее 10^{-10} M; или менее 10^{-10} M; или менее 10^{-11} M в анализе биоактивности флагеллина с использованием клеток HEK-Blue™ -hTLR5 (Invivogen), как описано в Lu Y., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2073–2085 (2013) и в Lu and Swartz, *Sci Rep* 6:18379 (2016), или в аналогичном анализе биоактивности TLR5.

[0039] В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5, предложенный в данном документе, является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5, предложенный в данном документе, является синтетическим. В некоторых

вариантах осуществления агонист TLR5, предложенный в данном документе, представляет собой средство на основе флагеллина. В некоторых вариантах осуществления средство на основе флагеллина содержится в различных видах грамположительных или грамотрицательных бактерий. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности флагеллина из 22 видов бактерий представлены на Фиг. 7 публикации патента США № 2003/0044429, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Таким образом, различия в последовательностях между видами включены в значение этого термина. В некоторых вариантах осуществления средство на основе флагеллина в соответствии с настоящим изобретением включает аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере 80% идентичностью, или по меньшей мере 85% идентичностью, или по меньшей мере 90% идентичностью, или по меньшей мере 95% идентичностью, или по меньшей мере 97% идентичностью, или по меньшей мере 98% идентичностью, или по меньшей мере 99% идентичностью, или 100% идентичностью с одним или более флагеллином из 22 видов бактерий, представленных на Фиг. 7 публикации патента США № 2003/0044429. Аминокислотные последовательности консервативных N- и C-концов (важных для активности TLR5) из 21 вида бактерий представлены на Фиг. 24A и 24B патента США № 8007812, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0040] В определенных вариантах осуществления средство на основе флагеллина в соответствии с настоящим изобретением включает фрагмент белка флагеллина или средство на основе флагеллина. В некоторых вариантах осуществления средство на основе флагеллина или его фрагмент характеризуются активностью агониста TLR5. В различных вариантах осуществления

[0041] агонист TLR5 представляет собой белок флагеллин *Salmonella,* например, рекомбинантный белок или синтетический белок флагеллин *Salmonella*. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5 представляет собой белок флагеллин *Salmonella dublin*, например, рекомбинантный белок или синтетический белок флагеллин *Salmonella dublin*. В различных вариантах осуществления белок флагеллина *Salmonella dublin* содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, как показано ниже:

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIA
NRFTSNIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNG
TNSDSDLKSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAND
GETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNGPKEATVGDLKSSFKNVTGYDTYAAG
ADKYRVDINSGAVVTDAAAPDKVYVNAANGQLTTDDAENNTAVDLFKT

TKSTAGTAEAKAIAGAIKGGKEGDTFDYKGVTFTIDTKTGDDGNGKVST
TINGEKVTLTVADIATGAADVNAATLQSSKNVYTSVVNGQFTFDDKTKN
ESAKLSDLEANNAVKGESKITVNGAEYTANATGDKITLAGKTMFIDKTAS
GVSTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITN
LGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQ
NVLSLLR (SEQ ID NO: 27).

[0042] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение агониста TLR5, содержащего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 27. В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, не содержит метку His.

[0043] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, агонистом TLR5 является энтолимод (CBLB502). Энтолимод (CBLB502) представляет собой полипептид, родственный флагеллину (см., например, Фиг. 7 публикации патента США № 2003/0044429, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В контексте данного документа термин, «энтолимод» (также известный как «CBLB502») относится к полипептиду, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1 заявки на патент WIPO WO/2016/109002 (включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме), как показано ниже:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVK
SLGLDGFNVNSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSAL
SKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNM
SKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 1).

[0044] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение агониста TLR5, содержащего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере около

80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1. В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, не содержит метку His.

[0045] В некоторых вариантах осуществления аспектов и вариантов, предложенных в данном документе, агонист TLR5, представляет собой средство на основе флагеллина, содержащее полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере 80% идентичностью или по меньшей мере 85% идентичностью, или по меньшей мере 90% идентичностью, или по меньшей мере 95% идентичностью, или по меньшей мере 97% идентичностью, или по меньшей мере 98% идентичностью, или по меньшей мере 99% идентичностью, или 100% идентичностью с одним или более из CBLB502-S33ML (SEQ ID NO: 35 из WO/2016/019034), CBLB502-485CT (CBLB533, SEQ ID NO: 71 из WO/2016/019034), CBLB502-S33MX (CBLB543, SEQ ID NO: 150 из WO/2016/019034), CBLB502-S33 (SEQ ID NO: 17 из WO/2016/019034), мутантом 33ML (SEQ ID NO: 42 из WO 2016/019034) из международной заявки на патент WO 2016/019034 (включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме), как показано ниже соответственно:

CBLB502-S33ML (SEQ ID NO: 35 из WO/2016/019034)

MSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGAL
NEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFN
GVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNSPGISGG
GGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNR
FDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQ
ANQVPQNVLSLLVPRGSHHHHHHG (SEQ ID NO: 2);

CBLB502-485CT (CBLB533, SEQ ID NO: 71 из WO/2016/019034)

MSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGAL
NEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFN
GVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNSPGSTAN
PLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDAD
YATEVSNMSKAQILQQAGLVPRGSHHHHHHG (SEQ ID NO: 3);

CBLB502-S33MX (CBLB543, SEQ ID NO: 150 из WO/2016/019034)

MSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNAADGISIAQTTEGAL
NEINNNLQRVRELSVQATAGANADAALKAIQAEIQQRLEEIDRVSQQTQA
AAVKVLSQDNAMAIQVGANDGAAITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNSPGST
ANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIED
ADYATEVSQMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLVPRGSHHHHH
HG (SEQ ID NO: 4);

CBLB502-S33 (SEQ ID NO: 17 из WO/2016/019034)

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDLVPRGSAKDPSGLRINSAKD
DAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRE
LSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQM
KIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNSPGISGGGGGILDSMGTLI
NEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTV
TNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSL
LR (SEQ ID NO: 5); и

мутант 33ML (SEQ ID NO: 42 из WO/2016/019034)

MSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGAL
NEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFN
GVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNSPGSTAN
PLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDAD
YATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLVPRGSHHHHHHG
(SEQ ID NO: 6).

[0046] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение агониста TLR5, содержащего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или 100% идентичностью последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 2-6. В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, не содержит метку His.

[0047] В некоторых вариантах осуществления аспектов и вариантов осуществления, предложенных в данном документе, агонист TLR5 представляет собой средство на основе флагеллина, содержащее полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере 80% идентичностью, или по меньшей мере 85%

идентичностью, или по меньшей мере 90% идентичностью, или по меньшей мере 95% идентичностью, или по меньшей мере 97% идентичностью, или по меньшей мере 98% идентичностью, или по меньшей мере 99% идентичностью, или 100% идентичностью с одной или несколькими SEQ ID NO: 243-252 Международной патентной заявки WO 2016/019134 (включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме), как показано ниже соответственно:

SEQ ID NO: 243 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGMEEFNMRINTNVAAMNTYSRLTAANTAKSNSLAKLSSG LRINKAGDDAAGLAISEKMKSQIGGLTQAKRNAQDGISLVQTAEGALNET HSILERMRDLAVQGSNGTLTSSDRGSINKELKALHQELTRISNTTEFNTQK LFSQTKQKSVTFTFQIGANAGQTLSVAITAMSGEALLVSTDAKFSLNAAG TNAGAMIKSIDAAIAKVSDQRADLGAVQNRLEHTINNLTATNENLSDANS RIRDVDMAEEMMTFTKSNILSQAATSMLAQANAMPNSVLNLLQG (SEQ ID NO: 7);

SEQ ID NO: 244 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGMRINHNISALNAWRNIDQTQYSMSKTLERLSSGLRINRA GDDAAGLAISEKMRGQIKGLNMAIKNAQDAISLIQTAEGALTEVHSILQR MRELAVQAASDTNTNVDREQIQKEIDQLREEIDRIARTTEFNTKKLLDGK LEGFRSQVDAKVVTGGNINVQLGTVSSKAVEGTYVIEVGAAERAIMVVD AAIHRVSTARAALGAIQNRLEHTISNLGVAAENLTAAESRIRDADMAKEM MEFTKQQILLQSSMAMLAQSNTLPQNVLQLMR (SEQ ID NO: 8);

SEQ ID NO: 245 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGLNMAIKNAQDAISLIQTAEGALTEVHSILQRMRELAVQA ASDTNTNVDREQIQKEIDQLREEIDRIARTTEFNTKKLLDGKLEGFRSQVD AKVVTGGNINVQLGTVSSKAVEGTYVIEVGAAERAIMVVDAAIHRVSTA RAALGAIQNRLEHTISNLG (SEQ ID NO: 9);

SEQ ID NO: 246 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGMSLRINNNIEALNAWRALNSTSNALQKSMEKLSSGLRIN RAGDDAAGLAISEKLRAQIRGLNQAIRNAQDGISLIQTAEGGLSEIQNILQ RMRELGVQAANGTLNNQDISAITTELNQLFNEIDRIAGATEFNTKNLLAV STGLVVTLQVGANAGQVIAFTIDNAGTASLGLSSADLAINDNASASAFISK VDSALQKVSTYRANLGSIQNRLEHTIANLGIASENLSASESRIRDVDMAAE MMNFTKNQILQQAGVAILAQANQAPQAVLQLLR (SEQ ID NO: 10);

SEQ ID NO: 247 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGLNQAIRNAQDGISLIQTAEGGLSEIQNILQRMRELGVQAA NGTLNNQDISAITTELNQLFNEIDRIAGATEFNTKNLLAVSTGLVVTLQVG ANAGQVIAFTIDNAGTASLGLSSADLAINDNASASAFISKVDSALQKVSTY RANLGSIQNRLEHTIANLG (SEQ ID NO: 11);

SEQ ID NO: 248 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGLNQAIRNAQDGISLIQTAEGGLSEIQNILQRMRELGVQAA NGTLNNQDISAITTELNQLFNEIDRIAGATEFNTKNLLAAGTASLGLSSAD LAINDNASASAFISKVDSALQKVSTYRANLGSIQNRLEHTIANLG (SEQ ID NO: 12);

SEQ ID NO: 249 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSASAFISKVDSALQKVSTYRANLGSIQNRLEHTIANLGPDGL NQAIRNAQDGISLIQTAEGGLSEIQNILQRMRELGVQAANGTLNNQDISAI TTELNQLFNEIDRIA (SEQ ID NO: 13);

SEQ ID NO: 250 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSNNQDISAITTELNQLFNEIDRIAGATGSGGLSEIQNILQRMR ELGVQAANGTLNGGSASAFISKVDSALQKVSTYRANLGSIQNRLEHTIAN LG (SEQ ID NO: 14);

SEQ ID NO: 251 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGLAQASRNAQDAISIAQTAEGALDETQSILQRVRELGVQG ANGTLTADDINALQAEVDQLIAEIDRIAGATEFNTQNLLDGSFTTKAFQV GANSGQNMTLTIGKMDTTTLGLSSADLAINDNAFANGAISTVDSALQKVS AERAKLGAIQNRLEHTIANLG (SEQ ID NO: 15); и

SEQ ID NO: 252 из WO 2016/019134

MGHHHHHHSGLAQASRQAQDAISIAQTAEGALDETQSILQRVRELGVQG ADGTLTADDIDALQAEVDQLIAEIDRIAGATEFATQKLLDGSFTTKAFQV GAASGQDVTLTIGKVDTTTLGLSSADLAIDSAAFADGAISTVDSALQKVS AERAKLGAIQNRLEHTIAQLG (SEQ ID NO: 16).

[0048] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение агониста TLR5, содержащего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей

мере около 93%, по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или 100% идентичностью последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 7-16. В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, не содержит метку His.

[0049] В некоторых вариантах осуществления аспектов и вариантов осуществления, предложенных в данном документе, агонист TLR5 представляет собой средство на основе флагеллина, содержащее полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере 80% идентичностью, или по меньшей мере 85% идентичностью, или по меньшей мере 90% идентичностью, или по меньшей мере 95% идентичностью, или по меньшей мере 97% идентичностью, или по меньшей мере 98% идентичностью, или по меньшей мере 99% идентичностью, или 100% идентичностью с одной или несколькими SEQ ID NO: 10, 12, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 или 44 из Международной патентной заявки WO 2006/069198 (включенной в данный документ посредством ссылки в полном объеме), как показано ниже соответственно:

SEQ ID NO: 10 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVK
SLGLDGFNVNSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSAL
SKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNL (SEQ ID NO: 17);

SEQ ID NO: 12 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRN
ANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQ
RLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSL
GLDGFNVNSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSK
VDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSK
AQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 18);

SEQ ID NO: 30 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI

QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVK
SLGLIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAV
RSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQ
QAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 19);

SEQ ID NO: 32 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRN
ANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQ
RLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSL
GLIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRS
SLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQ
AGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 20);

SEQ ID NO: 34 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIIPGI
SGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAI
QNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSV
LAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 21);

SEQ ID NO: 36 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRN
ANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQ
RLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIIPGISG
GGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQN
RFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLA
QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 22);

SEQ ID NO: 38 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVK
SLGLIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAV
RSSLGAIQNRFDSAITNL (SEQ ID NO: 23);

SEQ ID NO: 40 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIIPGI
SGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAI
QNRFDSAITNL (SEQ ID NO: 24);

SEQ ID NO: 42 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLT
QNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAS
RNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEI
QQRLEEIDRVSNQIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASID
SALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVS
NMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 25); и

SEQ ID NO: 44 из WO 2006/069198

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRN
ANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDEIQQ
RLEEIDRVSNQIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSAL
SKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNM
SKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 26).

[0050] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение агониста TLR5, содержащего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или 100% идентичностью последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 17-26. В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, не содержит метку His.

[0051] В некоторых вариантах осуществления аспектов и вариантов осуществления, предложенных в данном документе, агонист TLR5 представляет собой средство на основе флагеллина, содержащее полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере 80% идентичностью, или по меньшей мере 85%

идентичностью, или по меньшей мере 90% идентичностью, или по меньшей мере 95% идентичностью, или по меньшей мере 97% идентичностью, или по меньшей мере 98% идентичностью, или по меньшей мере 99% идентичностью, или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 28, как показано ниже:

MSGLRINSAKDDAAGQAAANRATSNIKGLTQASRNAADGISIAQTTEGAL NEINNNLQRVRELSVQATAGANADAALKAIQAEIQQRLEEIDRVSQQTQA AAVKVLSQDNAMAIQVGANDGAAITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNSPGST ANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIED ADYATEVSQMSKAQILDQAGTSTLAQLVPRGSHHHHHHG (SEQ ID NO: 28).

[0052] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение агониста TLR5, содержащего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся на по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 28. В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, не содержит метку His.

[0053] В соответствии с настоящим изобретением в некоторых вариантах осуществления антиген патогенного белка не слит с агонистом TLR5. Примеры патогенного белкового антигена, который в некоторых вариантах осуществления не будет слит с агонистом TLR5 и/или средством на основе флагеллина, как описано в данном документе, включает α-спиральный домен поверхностного белка A (PspA) и пневмококкового поверхностного белка A (PsaA) *Streptococcus pneumonia*; субъединицу гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) вируса гриппа; и шиповидный (S) белок вируса тяжелого острого респираторного синдрома (вирус SARS) и т.п.

Антигены и вакцины

[0054] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по снижению дозы вакцины по сравнению с дозой вакцины у пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по

снижению частоты введения вакцины по сравнению с частотой введения вакцины пациенту, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

[0055] В различных вариантах осуществления антигены, выбранные для способов и композиций по настоящему изобретению, не ограничивают настоящее изобретение. Антиген может представлять собой без ограничения целую клетку, вирус, белок, белковую субъединицу или фрагмент. В дополнительных вариантах осуществления антиген, который стимулирует иммунный ответ против нарушения, представляет собой составную часть инфекционного агента, выбранного из живого и аттенуированного, убитого, инактивированного и анатоксического инфекционного агента. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с опухолевой клеткой, клеткой с поврежденной ДНК или стареющей клеткой и/или стимулирует иммунный ответ против них.

[0056] Примеры вирусных антигенов, которые могут быть усилены посредством введения с агонистом TLR5 (например, средством на основе флагеллина), включают без ограничения антигены, полученные из и/или применимые для лечения или предупреждения ВИЧ, вирусов, вызывающих менингит и энцефалит, вирусов гепатита A, гепатита B, гепатита C, вируса бешенства, вируса полиомиелита, вируса гриппа, вируса кори, вируса паротита, вируса краснухи, вируса коклюша, вируса папилломы, вируса желтой лихорадки, респираторно-синцитиального вируса, парвовируса, вируса чикунгуньи, вирусов геморрагической лихорадки и вирусов герпеса, в частности, вируса ветряной оспы, цитомегаловируса и вируса Эпштейна-Барр.

[0057] Примеры бактериальных и микобактериальных антигенов включают антигены, полученные из и/или применимые против *менингококка, гемофильной палочки, пневмококка, стафилококка, лепры* и туберкулеза, среди прочего.

[0058] В частности, агонист TLR5 (например, средство на основе флагеллина), такой как, например, энтолимод, можно применять в комбинации с вакциной против вирусного или патогенного агента, такой как вакцина против гриппа, пневмококковая вакцина или вакцина против ВИЧ. Более конкретно, агонист TLR5 можно применять, как описано в данном документе, для усиления иммунного ответа на вакцину для любого штамма гриппа, такого как подтипы гриппа H1N1, H2N3 и B.

[0059] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение антигенов одной или нескольких одобренных вакцин, которые могут представлять собой антигены по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления одобренные вакцины включают: аденовирус; сибирская язва (Biothrax);

BCG (Tice); DT (Sanofi); DTaP (Daptacel); DTaP (Infanrix); DTaP-HepB-IPV (Pediarix); DTaP-IPV (Kinrix); DTaP-IPV/Hib (Pentacel); Hib (ActHIB); Hib (Hiberix); Hib (PedvaxHIB); Hib/Hep B (Comvax); Hib/Mening. CY (MenHibrix); Hep A (Havrix); Hep A (Havrix); Hep B (Engerix-B); Hep B (Recombivax); Hep A/Hep B (Twinrix); папилломавирус человека (HPV) (Cerverix); папилломавирус человека (HPV) (Gardasil); грипп (Afluria); грипп (Agriflu); грипп (Fluarix); грипп (Flublok); грипп (Flucelvax); грипп (Fluvirin); грипп (Flulaval); грипп (Fluzone: Standard, High-Dose, & Intradermal); грипп (FluMist); японский энцефалит (Ixiaro); менингококк (MCV4-Menactra); менингококк (MCV4-Menveo); менингококк (MPSV4-Menomune); MMR (MMR-II); MMRV (ProQuad); пневмококк (PCV13 – Prevnar 13); пневмококк (PPSV-23 – Pneumovax); полиомиелит (IPV – Ipol); бешенство (Imovax); бешенство (RabAvert); ротавирус (RotaTeq); ротавирус (Rotarix); оспа (Vaccinia – ACAM2000); Td (Decavac); Td (Tenivac); Td (Mass Biologics); Tdap (Adacel); Tdap (Boostrix); брюшной тиф (инактивированная – Typhim Vi); брюшной тиф (пероральная – Ty21a); ветряная оспа (Varivax); желтая лихорадка (YF-Vax); и зостер (опоясывающий лишай – Zostavax).

[0060] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается применение антигенов одной или нескольких одобренных вакцин в виде антигенов по настоящему изобретению. Иллюстративные вакцины включают, например, субъединичную вакцину и инактивированную или «убитую» вакцину (*например,* Infanrix-IPV/Hib (Bordetella pertussis), Infanrix-IPV/Hib (Haemophilus influenzae), Infanrix-IPV/Hib (Poliovirus), Infanrix-IPV/Hib (Clostridium tetani), Infanrix-IPV/Hib (Corynebacterium diphtheriae), Infanrix-hexa (Bordetella pertussis), Infanrix-hexa (Haemophilus influenzae), Infanrix-hexa (Poliovirus), Infanrix-hexa (Hepatitis B virus), Infanrix-hexa (Clostridium tetani), Infanrix-hexa (Corynebacterium diphtheriae), Infanrix-IPV (Bordetella pertussis), Infanrix-IPV (Poliovirus), Infanrix-IPV (Clostridium tetani), Infanrix-IPV (Corynebacterium diphtheriae), Infanrix/Hib (Corynebacterium diphtheriae), Pediarix (Clostridium tetani), Pediarix (Poliovirus), Pediarix (Hepatitis B virus), ViVaxim (Salmonella spp.), ViVaxim (Hepatitis A virus); субъединичные вакцины (*например,* 5CVMB (Neisseria meningitidis), вакцину на основе белка CyaA B. pertussis (Bordetella pertussis), вакцину на основе белка PTx B. pertussis (Bordetella pertussis), противораковую вакцину на основе белка VEGFA (рак), вакцину против E. coli с использованием полипептида интимина (Escherichia coli), Engerix-B (Hepatitis B virus), вакцину против H. pylori на основе белка VacA (Helicobacter pylori), HC типа C и D (Clostridium botulinum), Infanrix/Hib (Bordetella pertussis), Infanrix/Hib (Haemophilus influenzae), Infanrix/Hib (Clostridium tetani), субъединичную вакцину против M. gallisepticum на основе белка TM-1 (Mycoplasma gallisepticum), вакцину на основе

MDA-модифицированного пептида apo B-100 человека (атеросклероз), MSP3-LSP с гидроксида алюминием (Plasmodium spp.), субъединичную вакцину против паротита на основе белка HN (вирус паротита), вакцину против N. miningitidis на основе белка TBP2 (Neisseria meningitidis), вакцину против P. aeruginosa на основе белка OprI (Pseudomonas aeruginosa), субъединичную вакцину против P. falciparum на основе белка SE36 (Plasmodium spp.), субъединичную вакцину против аллергии вследствие Phleum pratense на основе Phl p 12 (аллергия), Recombivax HB (вирус гепатита B), вакцину против S. pneumoniae на основе белка ClpP (Streptococcus pneumoniae); анатоксическую вакцину (*например,* BoNT/F(Hc) (Clostridium botulinum), DAPTACEL (Corynebacterium diphtheriae), Infanrix (Bordetella pertussis), Infanrix (Clostridium tetani), KINRIX (Clostridium tetani), PBT (Clostridium botulinum), Pediarix (Bordetella pertussis), инактивированные или «убитые» вакцины (*например,* Avaxim (вирус гепатита A), Avaxim-Pediatric (вирус гепатита A), FSME-IMMUN (вирус клещевого энцефалита (TBEV)), Infanrix (Corynebacterium diphtheriae), Ixiaro (вирус японского энцефалита), KINRIX (Corynebacterium diphtheriae) и Pediarix (Corynebacterium diphtheriae)); и конъюгированные вакцины (например, конъюгат арабиноманнан-столбнячный анатоксин (Mycobacterium tuberculosis)), CCPS-P64kR (Neisseria meningitidis), COMVAX (Haemophilus influenzae), Menjugate (Neisseria meningitidis), Neisvac-C (Neisseria meningitidis) и PedvaxHIB (Haemophilus influenza)).

[0061] В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предполагается, что антигенами по настоящему изобретению могут быть одна или несколько противораковых вакцин и/или антигены одной или нескольких противораковых вакцин. Примеры противораковых вакцин включают терапевтические и профилактические вакцины. Например, противораковые вакцины включают ONCOPHAGE (ANTIGENICS INC., одобренную в России в 2008 г. для лечения рака почек), APC8015/Sipuleucel-T/PROVENGE (DENDREON, для лечения, *например,* метастатического рефрактерного к гормональной терапии рака предстательной железы), CANCERVAX (CANVAXIN), GENITOPE CORP (персонализированная иммунотерапия MYVAX) и FAVRILLE INC (FAVID), профилактические вакцины, которые атакуют онкогенные папилломавирусы человека (например, для лечения метастатического рефрактерного к гормональной терапии рака), CANCERVAX (CANVAXIN), GENITOPE CORP (MYVAX, персонализованная иммунотерапия) и FAVRILLE INC (FAVID), превентивные вакцины, которые атакуют онкогенные папилломавирусы человека (*например,* CERVARIX (GSK) и GARDASIL (MERCK)), вакцину против вируса гепатита A (*например,* CERVARIX (GSK) и GARDASIL (MERCK)) вакцину против вируса гепатита B (*например,* RECOMBIVAX

HB (MERCK), ENGERIX-B (GSK), ELOVAC B (HUMAN BIOLOGICALS INSTITUTE), GENEVAC B (SERUM INSTITUTE), SHANVAC B *и т.д.*

Патогенные инфекции

[0062] В другом аспекте способы, предложенные в данном документе, можно применять для лечения инфекции, вызванной патогеном, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой бактериальный патоген, например, бактериальный патоген, выбранный из *Meningococcus, Haemophilus, Pneumococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Moraxella, Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas, Enterobacter, Proteus, Serratia, Legionella, Salmonella, Shigella, Acinetobacer, Listeria, Chlamydia, Mycobacterium,* среди прочих.

[0063] В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирусный патоген, например, вирусный патоген, например, ВИЧ, вирусы, вызывающие менингит, вирусы, вызывающие энцефалит, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус бешенства, вирус полиомиелита, вирус гриппа, вирус парагриппа, аденовирус, риновирус, вирус кори, вирус паротита, вирус краснухи, вирус коклюша, папилломавирус, вирус желтой лихорадки, респираторно-синцитиальный вирус, парвовирус, норовирус, вирус чикунгунья, вирусы геморрагической лихорадки, вирус денге и вирусы герпеса, например, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус и вирус Эпштейна-Барра. В некоторых вариантах осуществления инфекция представляет собой вирусную инфекцию, такую как хроническая вирусная инфекция. В некоторых вариантах осуществления хроническая вирусная инфекция выбрана из гепатита А, гепатита В, гепатита С, вируса Эпштейна-Барра, ВИЧ, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1, вируса простого герпеса 2, папилломовируса человека, аденовируса и герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши. В некоторых вариантах осуществления хроническая вирусная инфекция включает ВИЧ.

[0064] Например, Lichterfeld и коллеги наблюдали, что ВИЧ-специфические CD8+ Т-клетки демонстрировали снижение длины теломер и повышение длины теломер и активности теломеразы при ингибировании PD-1 (см., например, Lichterfeld, M et al. (2008) Blood 112(9):3679-3687). В другом примере PD-1 значительно активировался в специфичных к гепатиту С (HVC) CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитах (см., например, Golden-Mason, L (2007) J. Virol. 81(17): 9249-9258).

[0065] В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция включает острую вирусную инфекцию нижних дыхательных путей. В некоторых вариантах осуществления вирусная острая инфекция нижних дыхательных путей вызвана риновирусом,

коронавирусом, вирусом гриппа, респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), аденовирусом и/или парагриппом. В некоторых вариантах осуществления острая вирусная инфекция нижних дыхательных путей представляет собой пневмонию. В некоторых вариантах осуществления острая вирусная инфекция нижних дыхательных путей включает абсцесс легкого. В некоторых вариантах осуществления острая вирусная инфекция нижних дыхательных путей включает бронхит.

[0066] В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой паразитический патоген, *например, токсоплазму, лейшмании и малярийного плазмодия, T. cruzii, гельминта, например, шистосому*.

В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой дрожжевой или грибковый патоген, например, *Candida, Cryptococcus* или *Coccidioides*.

Рак

[0067] Способы, описанные в данном документе, можно применять при любом раке. В варианте осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В варианте осуществления рак представляет собой гематологический рак. Рак может представлять собой карциному, саркому, миелому, лейкоз, лимфому или рак смешанного типа. В некоторых вариантах осуществления антиген, предусмотренный настоящим изобретением, ассоциирован с опухолевой клеткой и/или стимулирует иммунитет против нее.

[0068] Противораковые вакцины обычно включают антиген, экспрессируемый и выделенный из раковой клетки, или раковую клетку, трансфицированную и способную экспрессировать выбранный антиген. Например, любой очищенный опухолевый антиген можно вводить с агонистом TLR5 (например, средством на основе флагеллина), таким как энтолимод, как описано для патогенных вакцин. Идентификация соответствующих раковых антигенов позволит разработать такие вакцины. В качестве альтернативы, другие противораковые терапевтические средства разработаны с применением антигена, обычно не экспрессируемого на раковой клетке. Например, выбранный антиген может быть трансфицирован в раковую клетку, а сама трансфицированная клетка, экспрессирующая антиген, используется в качестве вакцины или терапевтического средства.

[0069] В некоторых вариантах осуществления рак ассоциирован с повышенными процентными содержаниями PD1+ Т-клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, который, как правило, реагирует на лекарственные средства, нацеленные на PD-1, такой как меланома. В определенных

вариантах осуществления рак представляет собой рак, который, как правило, отвечает на виды иммунотерапии, направленные на Т-клетки, такой как почечно-клеточная карцинома. В варианте осуществления рак представляет собой рак, который можно лечить посредством повышения соотношения PD-1 отрицательных и PD-1 положительных Т-клеток.

[0070] Примеры различных видов рака, которые подлежат лечению посредством способов, раскрытых в данном документе, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, рак матки, рак маточных труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или уретры, рак почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль оси позвоночника, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидное рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, связанные с экологией онкологические заболевания, включая онкологические заболевания, вызванные асбестом, и комбинации указанных видов онкологических заболеваний.

[0071] Примеры солидных опухолей, которые можно лечить посредством способов, раскрываемых в данном документе, включают злокачественные новообразования, например, саркомы, аденокарциномы и карциномы различных систем органов, такие как поражающие печень, легкие, молочную железу, лимфоидные ткани, желудочно-кишечный тракт (например, толстую кишку), мочеполовую систему. тракта (например, почечные, уротелиальные клетки), предстательной железы и глотки. Аденокарциномы включают злокачественные новообразования, такие как большинство видов рака толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточная карцинома, рака печени, немелкоклеточная карцинома легкого, рак тонкой кишки и рак пищевода. В одном варианте осуществления, рак представляет собой меланому, например, меланому на поздней стадии. Метастатические поражения вышеупомянутых видов рака также можно лечить или предупреждать с применением способов и композиций по настоящему изобретению.

[0072] Способы, описанные в данном документе, можно применять для лечения любого из следующих видов рака:

[0073] Рак пищеварительного/желудочно-кишечного тракта, такой как рак анального канала; рак желчных протоков; рак внепеченочных желчных протоков; рак аппендикса; карциноидная опухоль, рак желудочно-кишечного тракта; рак толстой кишки; колоректальный рак, в том числе колоректальный рак у детей; рак пищевода, в том числе рак пищевода у детей; рак желчного пузыря; рак желудка, в том числе рак желудка у детей; гепатоцеллюлярный рак (рак печени), в том числе (первичный) гепатоцеллюлярный рак (рак печени) у взрослых и (первичный) гепатоцеллюлярный рак (рак печени) у детей; рак поджелудочной железы, в том числе рак поджелудочной железы у детей; саркома, рабдомиосаркома; островково-клеточный рак поджелудочной железы; рак прямой кишки; и рак тонкой кишки;

[0074] Эндокринные виды рака, такие как карцинома островковых клеток (эндокринная поджелудочная железа); адренокортикальная карцинома, в том числе адренокортикальная карцинома у детей; карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта; рак паращитовидной железы; феохромоцитома; опухоль гипофиза; рак щитовидной железы, в том числе рак щитовидной железы у детей; синдром множественной эндокринной неоплазии у детей; и карциноидная опухоль у детей;

[0075] Виды рака глаз, такие как внутриглазная меланома; и ретинобластома;

[0076] Виды рака опорно-двигательного аппарата, такой как опухоли семейства Юинга; остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости; рабдомиосаркома у детей; саркома мягких тканей, в том числе саркома мягких тканей у взрослых и детей; светлоклеточная саркома сухожильных влагалищ; и саркома матки;

[0077] Рак молочной железы, такой как рак молочной железы, в том числе рак молочной железы у детей и мужчин и во время беременности;

[0078] Неврологические виды рака, такие как глиома ствола головного мозга у детей; опухоль головного мозга; мозжечковая астроцитома у детей; церебральная астроцитома/злокачественная глиома у детей; эпендимома возраста у детей; медуллобластома у детей; пинеальные и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; глиома зрительного пути и гипоталамуса у детей; другие виды рака головного мозга у детей; адренокортикальная карцинома; лимфома центральной нервной системы, первичная; мозжечковая астроцитома у детей; нейробластома; краниофарингиома; опухоли спинного мозга; атипичная

тератоидная/рабдоидная опухоль центральной нервной системы; эмбриональные опухоли центральной нервной системы; и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и опухоль гипофиза у детей;

[0079] Рак мочеполовой системы, такой как рак мочевого пузыря, в том числе рак мочевого пузыря у детей; почечно-клеточный (почечный) рак; рак яичников, в том числе рак яичников у детей; эпителиальный рак яичников; опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом; рак полового члена; рак предстательной железы; почечно-клеточный рак, в том числе почечно-клеточный рак у детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; рак яичек; рак уретры; рак влагалища; рак вульвы; рак шейки матки; опухоль Вильмса и другие опухоли почек у детей; рак эндометрия; и гестационная трофобластическая опухоль;

[0080] Рак зародышевых клеток, такой как экстракраниальная опухоль зародышевых клеток у детей; внегонадная герминогенная опухоль; герминогенная опухоль яичников; и рак яичка;

[0081] Рак головы и шеи, такой как рак губы и полости рта; рак полости рта, в том числе рак полости рта у детей; гипофарингеальный рак; рак гортани, в том числе рак гортани у детей; метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным поражением; рак ротовой полости; рак полости носа и околоносовых пазух; рак носоглотки, в том числе рак носоглотки у детей; рак ротоглотки; рак паращитовидной железы; рак глотки; рак слюнных желез, в том числе рак слюнных желез у детей; рак горла; и рак щитовидной железы;

[0082] Рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого; и мелкоклеточный рак легкого;

[0083] Рак органов дыхания, такой как злокачественная мезотелиома у взрослых; злокачественная мезотелиома у детей; злокачественная тимома; тимома у детей; карцинома тимуса; бронхиальные аденомы/карциноиды, в том числе бронхиальные аденомы/карциноиды у детей; плевропульмональная бластома; немелкоклеточный рак легкого; и мелкоклеточный рак легкого;

[0084] Различные виды рака кожи, такие как саркома Капоши; карцинома из клеток Меркеля; меланома; и рак кожи у детей;

[0085] Злокачественные новообразования, связанные со СПИДом;

[0086] Другие виды рака у детей, необычные виды рака у детей и виды рака с неизвестной первичной локализацией; и метастазы вышеупомянутых видов рака также можно лечить или предупреждать в соответствии со способами, описанными в данном документе.

[0087] Способы, описанные в данном документе, можно применять для лечения гематологического рака или злокачественного новообразования или предракового состояния, например, лейкоза или лимфомы. Рак может представлять собой рак, ассоциированный с экспрессией опухолеассоциированного антигена, как описано в данном документе. Гематологические виды рака и злокачественные новообразования включают один или несколько острых лейкозов, в том числе, например, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз («BALL»), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз («TALL»), острый лимфоидный лейкоз (или острый лимфобластный лейкоз) (ALL), в том числе острый лимфолейкоз у взрослых и детей; острый миелоидный лейкоз, в том числе острый миелоидный лейкоз у взрослых и детей; один или несколько хронических лейкозов, например, хронический миелогенный лейкоз (CIVIL), хронический лимфоидный лейкоз (или хронический лимфоцитарный лейкоз) (CLL). Дополнительные виды рака или гематологические состояния, которые можно лечить посредством способов, раскрытых в данном документе, включают, например, лимфому, связанную со СПИДом, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, хронические миелопролиферативные заболевания; кожную Т-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, лимфому Ходжкина (в том числе лимфома Ходжкина у взрослых и детей и лимфома Ходжкина во время беременности), мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, мантийно-клеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, множественную миелому, множественную миелому/новообразование плазматических клеток, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, миелодиспластические/миелопролиферативные нарушения, грибовидный микоз, неходжкинскую лимфому (в том числе неходжкинскую лимфому у взрослых и детей и неходжкинскую лимфому во время беременности), плазмобластную лимфому, плазмоцитоидное новообразование дендритных клеток, синдром Сезари, макроглобулинемию Вальденстрема, первичную центральную системную лимфому и «прелейкоз», которые представляют собой разнообразный набор гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и т.п. Кроме того, заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолеассоциированного антигена, как описано в данном документе,

включает без ограничения, например, атипичные и/или не классические виды рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией опухолеассоциированного антигена, как описано в данном документе.

Эффективность вакцины

[0088] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по усилению врожденных и/или адаптивных иммунных ответов у пациента. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению для улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента включают поддержание и/или увеличение популяции Т-клеток пациента (например, популяции CD4+ и/или CD8+ Т-клеток). В дополнительных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают ослабление возрастного старения иммунной системы, как измеряется по повышению или восстановлению титров антигенспецифических антител пациента (например, IgG, IgM и IgA).

[0089] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, как измеряется по более высоким уровням титра антигенспецифических антител по сравнению с уровнями титра антигенспецифических антител у пациентов, которым не вводили агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по усилению врожденного иммунного ответа пациента по сравнению с врожденным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5. В дополнительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по усилению адаптивного иммунного ответа пациента по сравнению с адаптивным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления врожденный иммунный ответ и адаптивный иммунный ответ пациента усиливаются по сравнению с врожденным и адаптивным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5.

[0090] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по увеличению и/или восстановлению популяции(ей) Т-клеток пациента по сравнению с популяциями Т-клеток пациента. которому не вводили агонист TLR5. Например, в

дополнительных вариантах осуществления количество Т-клеток пациента, в том числе Т-клеток, выбранных из одной или нескольких CD4+ эффекторных Т-клеток, CD8+ эффекторных Т-клеток, CD4+ Т-клеток памяти, CD8+ Т-клеток памяти, CD4+ Т-клеток центральной памяти, CD8+ Т-клеток центральной памяти, естественных Т-клеток-киллеров, CD4+ клеток-хелперов (в том числе без ограничения Th1, Th2 и Th17) и CD8+ цитотоксических клеток повышается и/или восстанавливается по сравнению с популяциями Т-клеток пациента, которому не вводили агонист TLR5.

[0091] Более конкретно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по повышению и/или восстановлению субпопуляций Т-клеток у пациента. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой Т-клетки-хелперы (*например,* T_h-клетки). В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки-хелперы секретируют цитокины, которые привлекают один или несколько макрофагов, нейтрофилов, других лимфоцитов и других цитокинов для дальнейшего направления этих клеток. В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-хелперные клетки представляют собой одну из нескольких подгрупп, в том числе Th1, Th2, Th17, Th9 и Tfh, при этом каждая подгруппа выполняет разную функцию.

[0092] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой цитотоксические клетки, которые необязательно продуцируют цитокины IL-2 и IFNγ. В дополнительных вариантах осуществления эти Т-клетки представляют собой цитотоксические CD8+ Т-клетки (также известные как T_C-клетки или Т-киллеры).

[0093] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти, индуцированные способами по настоящему изобретению, являются долгоживущими и могут размножаться до большого количества эффекторных Т-клеток при повторном воздействии их когнатного им антигена. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти обеспечивают иммунную систему пациента памятью против ранее встречавшихся патогенов. В дополнительных вариантах осуществления популяции Т-клеток памяти включают без ограничения тканевые резидентные Т-клетки памяти (Trm), стволовые клетки TSCM памяти и Т-клетки виртуальной памяти. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти классифицируются как CD4+ или CD8+ и экспрессируют CD45RO. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти дополнительно дифференцируются в различные подгруппы. Например, в некоторых вариантах осуществления подгруппы Т-клеток памяти включают: Т-клетки центральной памяти (T_{CM}-клетки), которые могут экспрессировать CD45RO, С-С-хемокиновый рецептор типа

7 (CCR7), L-селектин (CD62L) и CD44; эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}-клетки и клетки T_{EMRA}), которые экспрессируют CD45RO и CD44, но не экспрессируют CCR7 и CD62L; резидентные тканевые Т-клетки памяти (T_{RM}), которые ассоциированы с интегрином αeβ7; Т-клетки виртуальной памяти.

[0094] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по снижению дозы вакцины по сравнению с дозой вакцины у пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам улучшения и/или повышения эффективности вакцины у пациента, измеряемой по снижению частоты введения вакцины по сравнению с частотой введения вакцины пациенту, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

Субъекты

[0095] Способы, предложенные в данном документе, можно применять для пациента, который представляет собой млекопитающее, в том числе людей и отличных от человека млекопитающих. Отличные от человека млекопитающие, которых обрабатывали с применением способов настоящего изобретения, включают одомашненных животных (т.е. собак, кошек, мышей, грызунов и зайцеобразных) и сельскохозяйственных животных (быков, лошадей, овец, свиней). В различных примерах индивидуум, которому вводят соединение или композицию, представляет собой индивидуум, который находится в группе риска, подозревается в наличии или у него диагностировано связанное с возрастом заболевание или расстройство.

[0096] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения пациент является человеком молодого возраста, человеком среднего возраста, или человеком пожилого возраста, или человеком старческого возраста. Например, в некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет от около 18 до около 35 лет, или от около 18 до около 30 лет, или от около 18 до около 25 лет, или от около 18 до около 20 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет от около 36 до около 55 лет, или от около 40 до около 55 лет, или от около 45 до около 55 лет, или от около 36 до около 50 лет, или от около 36 до около 45 лет, или от около 36 до около 40 лет, или от около 40 до около 50 лет, или от около 45 до около 55 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет от около 56 до около 85 лет, или от около 60 до около 85 лет, или от около 65 до около 85 лет, или от около 70 до около 85 лет, или от около 75 до около 85 лет, или от 80 до около 85 лет, или от 56 до около 80 лет, или от 56

до около 75 лет, или от 56 до около 70 лет, или от 56 до около 65 лет, или от 56 до около 60 лет, или от около 60 лет до около 80 лет, или от около 65 лет до около 75 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет более 65 лет или равен ему.

[0097] В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет около 1, или около 2, или около 3, или около 4, или около 5, или около 6, или около 7, или около 8, или около 9, или около 10, или около 11, или около 12, или около 13, или около 14, или около 15, или около 16, или около 17, или около 18, или около 19, или около 20, или около 21, или около 22, или около 23, или около 24, или около 25, или около 26, или около 27, или около 28, или около 29, или около 30, или около 31, или около 32, или около 33, или около 34, или около 35, или около 36, или около 37, или около 38, или около 39, или около 40, или около 41, или около 42, или около 43, или около 44, или около 45, или около 46, или около 47, или около 48, или около 49, или около 50, или около 51, или около 52, или около 53, или около 54, или около 55, или около 56, или около 57, или около 58, или около 59, или около 60, или около 61, или около 62, или около 63, или около 64, или около 65, или около 66, или около 67, или около 68, или около 69, или около 70, или около 71, или около 72, или около 73, или около 74, или около 75, или около 76, или около 77, или около 78, или около 79, или около 80, или около 81, или около 82, или около 83, или около 84, или около 85 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет по меньшей мере 55 лет. В некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет по меньшей мере 65 лет.

[0098] Специалист в данной области техники должен учитывать, что возрастные диапазоны в отношении определений «молодой», «средний» и «пожилой» или «старческий» могут варьироваться в зависимости от географического региона, среди других факторов. В Petry, *Gerontologist* 2002 Feb;42(1):92-9 описаны возрастные определения и включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0099] В вариантах осуществления биологический пол пациента является мужским или женским. В вариантах осуществления биологический пол пациента является мужским. В вариантах осуществления биологический пол пациента является женским.

[00100] В вариантах осуществления биологический пол пациента является мужским и возраст пациента является средним (например, от около 36 до около 55 лет, или от около 40 до около 55 лет, или от около 45 до около 55 лет, или от около 36 до около 50 лет, или от около 36 до около 45 лет, или от около 36 до около 40 лет, или от около 40 до около 50 лет, или от около 45 до около 55 лет, или от около 36 до около 64 лет, или от около 40 до

около 64 лет, или от около 45 до около 64 лет). В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению, например, применительно к пациенту мужского пола среднего возраста, предупреждают или снижают тяжесть одного или нескольких видов старческой астении и связанных с возрастом заболеваний или нарушений.

[00101] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является пациент. В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек среднего возраста. Например, в некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет от около 36 до 64 лет. В дополнительных вариантах осуществления биологический пол пациента является мужским.

[00102] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является пациент. В некоторых вариантах осуществления пациент является пациентом старческого возраста. Например, в некоторых вариантах осуществления возраст пациента составляет около 65 лет или больше. В дополнительных вариантах осуществления биологический пол пациента является мужским.

[00103] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, пациентом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, пациентом является человек. В определенных вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, пациентом является мужчина.

Доза, способ применения и фармацевтический состав

[00104] В вариантах осуществления фармацевтический препарат агониста TLR5 применяется в различных способах, и в некоторых вариантах осуществления он может находиться в стандартной лекарственной форме. В такой форме препарат подразделяется на стандартные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Стандартная лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат, при этом упаковка содержит дискретные количества препарата, такие как упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Кроме того, стандартная лекарственная форма может представлять собой капсулу, таблетку, крахмальную капсулу или пастилку, или это может быть соответствующее количество любой из них в упакованной форме. При желании композиция может также содержать другие совместимые терапевтические средства. Некоторые фармацевтические препараты могут доставлять соединения по настоящему изобретению в составе с замедленным высвобождением.

[00105] Лекарственная форма агониста TLR5 по настоящему изобретению необязательно может быть жидкой лекарственной формой. Растворы можно приготовить в воде, смешанной подходящим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза, или эмульгатором, таким как полисорбат. Также можно приготовить дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, DMSO и их смесях со спиртом или без него, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант, предупреждающий рост микроорганизмов. Стандартные процедуры и ингредиенты для выбора и приготовления подходящих составов описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (2003-20-е изд.) и в The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19), опубликованной в 1999 г. Составы необязательно содержат наполнители, в том числе без ограничения буферные средства, антиоксидант, стабилизатор, носитель, разбавитель и средства для регуляции pH. Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсию и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например*, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN, PLURONICS или полиэтиленгликоль (PEG).

[00106] При лечении доза агониста TLR5 необязательно колеблется от около 0,0001 мг/кг до около 100 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 0,15 мг/кг до около 3 мг/кг, от около 0,5 мг/кг до около 2 мг/кг и от около 1 мг/кг до около 2 мг/кг массы тела субъекта. В других вариантах осуществления доза находится в диапазоне от около 100 мг/кг до около 5 г/кг, от около 500 мг/кг до около 2 мг/кг и от около 750 мг/кг до около 1,5

г/кг массы тела субъекта. Например, в зависимости от типа и тяжести заболевания или нарушения, от около 1 мкг/кг до 15 мг/кг (*например*, 0,1-20 мг/кг) средства является дозой-кандидатом для введения пациенту, будь то, например, одно или несколько отдельных введений или непрерывная инфузия. Типичная суточная доза находится в диапазоне от около 1 мг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания или нарушения. Однако могут быть применимы и другие режимы введения дозы. Стандартные дозы могут находиться в диапазоне, например, от около 5 мг до 500 мг, например, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг и 300 мг. Прогресс терапии отслеживают с помощью обычных методик и анализов.

[00107] В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят пациенту-человеку в эффективном количестве (или дозе), составляющем(ей) менее около 1 мкг/кг, например, от около 0,35 до около 0,75 мкг/кг или от около 0,40 до около 0,60 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод) составляет около 0,35 мкг/кг, или около 0,40 мкг/кг, или около 0,45 мкг/кг, или около 0,50 мкг/кг, или около 0,55 мкг/кг, или около 0,60 мкг/кг, или около 0,65 мкг/кг, или около 0,70 мкг/кг, или около 0,75 мкг/кг, или около 0,80 мкг/кг, или около 0,85 мкг/кг, или около 0,90 мкг /кг, или около 0,95 мкг/кг, или около 1 мкг/кг. В различных вариантах осуществления абсолютная доза флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод) составляет от около 2 мкг/субъекта до около 45 мкг/субъекта, или от около 5 до около 40, или от около 10 до около 30, или от около 15 мкг/субъекта до 25 мкг/субъекта. В некоторых вариантах осуществления абсолютная доза флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод) составляет около 20 мкг, или около 30 мкг, или около 40 мкг.

[00108] В различных вариантах осуществления доза агониста TLR5, *например*, флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод) можно определить по массе тела пациента. Например, абсолютная доза флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод), составляет около 2 мкг для пациента человека детского возраста массой тела от около 0 до около 5 кг (*например*, около 0, или около 1, или около 2, или около 3, или около 4, или около 5 кг); или около 3 мкг для ребенка-человека массой тела от около 6 до около 8 кг (*например*, около 6, или около 7, или около 8 кг), или около 5 мкг для пациента-человека детского возраста массой тела от около 9 до

около 13 кг (*например* 9 или около 10, или около 11, или около 12, или около 13 кг); или около 8 мкг для пациента-человека детского возраста массой тела от около 14 до около 20 кг (*например*, около 14, или около 16, или около 18, или около 20 кг), или около 12 мкг для пациента-человека детского возраста массой тела от около 21 до около 30 кг (*например* около 21, или около 23, или около 25, или около 27, или около 30 кг), или около 13 мкг для пациента-человека детского возраста массой тела от около 31 до около 33 кг (*например*, около 31, или около 32, или около 33 кг), или около 20 мкг для взрослого человека-пациента массой тела от около 34 до около 50 кг (*например*, около 34, или около 36, или около 38, или около 40, или около 42, или около 44, или около 46, или около 48, или около 50 кг), или около 30 мкг для взрослого человека-пациента массой тела от около 51 до около 75 кг (*например*, около 51, или около 55, или около 60, или около 65, или около 70, или около 75 кг), или около 45 мкг для взрослого пациента-человека с массой тела более около 114 кг (*например*, около 114, или около 120, или около 130, или около 140, или около 150 кг).

[00109] В определенных вариантах осуществления агонист TLR5, например, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) в соответствии со способами, предложенными в данном документе, вводят подкожно (s.c.), внутривенно (i.v.), внутримышечно (i.m.), интраназально или местно. Введение флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод), описанного в данном документе, может независимо осуществляться от одного до четырех раз в день, или от одного до четырех раз в месяц, или от одного до шести раз в год, или один раз каждые два, три, четыре или пять лет. Введение может осуществляться в течение одного дня или одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, шести месяцев, одного года, двух лет, трех лет и может осуществляться даже в течение всей жизни пациента-человека. Доза может быть введена в виде однократной дозы или разделена на несколько доз. В некоторых вариантах осуществления флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят от около 1 до около 3 раз (*например*, 1, или 2, или 3 раза). В некоторых вариантах осуществления флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят однократно.

[00110] В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят в один или несколько циклов. В определенных вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят в течение

одного или нескольких циклов, в которых цикл включает введение пациенту дозы один раз в день в течение одного дня; или один раз в день в течение двух дней; или один раз в день в течение трех дней; или один раз в день в течение четырех дней; или один раз в день в течение пяти дней. В определенных вариантах осуществления способов, предложенных в данном документе, агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят в течение одного или нескольких циклов, как предложено в данном документе, и при этом вводят не более 5 циклов в год; или вводят не более 3 циклов в год; или не более 2 циклов в год.

[00111] Различные способы введения агониста TLR5, *например*, флагеллина или средства на основе флагеллина (такого как энтолимод), предусмотрены в данном документе. В одном варианте осуществления агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят путем инъекции, *например*, внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления агонист TLR5, *например*, флагеллин или средство на основе флагеллина (такое как энтолимод) вводят путем однократной внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется с применением набора, описанного в данном документе (*например*, в виде стандартной лекарственной формы, *например*, предварительно загруженного (также известного как предварительно дозированного или предварительно заполненного) шприца или шприца-ручки (ручки для инъекций)).

Наборы

[00112] В настоящем изобретении предложены наборы, которые могут упростить введение любого средства, описанного в данном документе. Иллюстративный набор по настоящему изобретению содержит любую композицию, описанную в данном документе, в стандартной лекарственной форме. В одном варианте осуществления стандартная лекарственная форма представляет собой контейнер, такой как предварительно заполненный шприц, который может быть стерильным, содержащий любое средство, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, наполнитель или основу. Набор может дополнительно содержать этикетку или напечатанные инструкции по применению любого средства, описанного в данном документе. В набор также может входить векорасширитель, анестетик для местного применения и очищающее средство для места введения. Набор также может дополнительно содержать одно или более дополнительных средств, описанных в данном

документе. В одном варианте осуществления набор содержит контейнер, содержащий эффективное количество композиции по настоящему изобретению и эффективное количество другой композиции, такой как описана в данном документе.

Определения

[00113] В отношении средств, описанных в данном документе, термины «модулировать» и «модуляция» относятся к усилению (*т.е.*, активации или стимуляции) или подавлению (*т.е.*, ингибированию или подавлению) ответа. «Модулятор» представляет собой средство, соединение или молекулу, которые модулируют, и могут представлять собой, например, агонист, антагонист, активатор, стимулятор, супрессор или ингибитор. Термины «ингибировать», «уменьшать», «удалять» в контексте данного документа, относятся к любому ингибированию, уменьшению, снижению, подавлению, подавлению или предупреждению экспрессии, активности или симптома и включают частичное или полное ингибирование активности или симптома. Частичное ингибирование может означать уровень экспрессии, активности или симптома, который составляет, например, менее 95 %, менее 90 %, менее 85 %, менее 80 %, менее 75 %, менее 70 %, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% неингибированной экспрессии, активности или симптома. Термины «устранить» или «избавиться от» указывают на полное снижение активности или симптома.

[00114] В контексте данного документа термин «нарушение» или «заболевание» относится к любому расстройству или нарушению функции; болезненному физическому или психическому состоянию. См. Dorland's Illustrated Medical Dictionary, (W.B. Saunders Co. 27th ed. 1988).

[00115] В контексте данного документа термин «осуществление лечения» или «лечение» любого заболевания или нарушения относится в одном варианте осуществления к облегчению заболевания или нарушения (*т.е.*, к замедлению, остановке или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления термин «осуществление лечения» или «лечение» относится к облегчению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут быть неразличимы пациентом. В еще одном варианте осуществления термин «осуществление лечения» или «лечение» относится к модулированию заболевания или нарушения либо физически (*например*, стабилизация различимого симптома), либо физиологически (*например*, стабилизация физического параметра), либо и то, и другое. В еще одном варианте осуществления термин

«осуществление лечения» или «лечение» относится к предупреждению или замедлению начала или развития или прогрессирования заболевания или нарушения.

[00116] Термин «терапевтически эффективное количество» в контексте данного документа означает количество соединения или композиции (такой как описано в данном документе), которая вызывает по меньшей мере одно требуемое изменение в клетке, популяции клеток, ткани, индивидууме, пациенте и т.п. В некоторых вариантах осуществления термин «терапевтически эффективное количество» в контексте данного документа означает количество соединения или композиции (такой как описано в данном документе), которое предупреждает или обеспечивает клинически значимое изменение заболевания, нарушения или состояния (*например*, снижение на по меньшей мере около 30 процентов, по меньшей мере около 50 процентов или по меньшей мере около 90 процентов) или при одном или нескольких признаках заболевания, нарушения или состояния, описанных в данном документе.

ПРИМЕРЫ

[00117] Настоящее изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем какого-либо изобретения или изобретений, описанных в формуле изобретения.

Пример 1: Совместное введение с энтолимодом повышает эффективность вакцинации

[00118] В этом примере описано применение фармакологического средства на основе флагеллина для улучшения или усиления иммунного ответа у вакцинированных мышей по сравнению с вакцинированными мышами, которые не получали средство на основе флагеллина.

[00119] В частности, оценивали влияние энтолимода на эффективность вакцинации самцов мышей разного возраста. Как показано в Табл. 1, группы самцов мышей NIH Swiss молодого (30 недель), среднего (73 недели) и старшего (113 недель) возраста вакцинировали пневмококковой вакциной Prevnar13 (0,125 мкг) отдельно или в комбинации с дозой энтолимода в дозе 0,1 мкг/мышь или 1,0 мкг/мышь, вводимого подкожно. В контрольных группах вместо энтолимода вводили контрольную дозу PBS.

Таблица 1. Схема исследования эксперимента по эффективности вакцины с энтолимодом

№ группы	**Количество мышей (самцы NIH Swiss)**	**Возраст в начале эксперимента (недели)**	**Иммунизация в дни 1 и 15**		**Оценка**
			Доза Prevnar13 (мкг/мышь)	**Доза энтолимода (мкг/мышь)**	
1	5	30	0,125	н.о.*	Сбор сыворотки крови в дни 0, 12 и 27. Умерщвление и сбор селезенки в день 27.
2	5	30	0,125	0,1	
3	5	30	0,125	1,0	
4	5	73	0,125	н.о.*	
5	5	73	0,125	0,1	
6	5	73	0,125	1,0	
7	5	113	0,125	н.о.*	
8	6	113	0,125	0,1	
9	6	113	0,125	1,0	

* Вместо энтолимода вводили PBS

[00120] Дозу вакцины для мышей ранее определяли с применением формулы, основанной на площади поверхности, эквивалентной дозе для человека Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) (Haas, *J Infect Dis.* 2014 Jan 1; 209(1): 87–97, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Мышей во всех группах вакцинировали в день 1 эксперимента и вводили бустерную дозу в день 15. Образцы сыворотки крови собирали до первой иммунизации («День 0», исходный уровень) и в дни 12 и 27. Эксперимент заканчивали в день 27, после чего мышей подвергали эвтаназии и собирали селезенки для анализа в отношении популяций Т-клеток. Схематическое представление временной шкалы эксперимента показано на Фиг. 1.

[00121] Для оценки эффективности вакцинации в каждой группе мышей образцы сыворотки крови тестировали в отношении уровней специфических для пневмококка/Prevnar13 антител IgG и IgM с применением имеющихся в продаже наборов для ELISA, а результаты представлены на Фиг. 2. Уровни специфических для

пневмококка/Prevnar13 антител IgG (левые панели) и IgM (правые панели) измеряли посредством ELISA в образцах сыворотки крови, собранных в день 12 или день 27 после иммунизации в день 1 (с бустерной иммунизацией, проведенной в день 15). Показаны средние титры антител, где * указывает на статистически значимые различия, определенные с помощью t-критерия Стьюдента. Все другие сравнения между соответствующими группами, обработанными PBS и обработанными энталимодом, были статистически незначимыми (P>0,3). На фигурах FL представляет собой синоним энтолимода для этого эксперимента.

[00122] Введение энтолимода вместе с вакциной Prevnar13 не продемонстрировало повышения выработки антител у мышей пожилого возраста (113 недель) ни в одной из тестируемых концентраций. Мыши молодого (30 недель) возраста гораздо лучше реагировали на вакцинацию, продуцируя очень высокие титры специфических IgG и IgM (в 10 раз выше, чем уровни, наблюдаемые у животных пожилого возраста), однако совместное введение энтолимода не приводило к дальнейшему повышению. Однако повышенный иммунный ответ обнаруживали в когорте мышей среднего возраста (73 недели). Все мыши среднего возраста реагировали на иммунизацию вакциной Prevnar13, но титры индуцированных антител были очень низкими, как и у мышей пожилого возраста. Однако эти уровни антител были значительно повышены при совместном введении энтолимода с вакциной (~7 раз для IgG и ~2 раза для IgM для групп, обработанных 0,1 мкг/мышь энтолимода). Интересно, что более низкая концентрация энтолимода, тестируемая в этом эксперименте (0,1 мкг/мышь), была более эффективной, чем более высокая концентрация (1,0 мкг/мышь).

Пример 2: Совместное введение с энтолимодом стимулирует эффекторы иммунного ответа

[00123] В этом эксперименте оценивали влияние введения энтолимода на количество и фенотип Т-клеток, активируемых в ответ на вакцинацию.

[00124] Селезенки мышей, обработанных в день 27 после первоначальной иммунизации, собирали и готовили суспензию отдельных клеток всех клеток селезенки и окрашивали антителами против маркеров лимфоцитов и Т-клеток. Абсолютное количество и процентное содержание различных клеточных популяций определяли посредством проточной цитометрии. В частности, аликвоты 100 мкл (1×10^6 клеток) клеточной суспензии помещали в полистироловые круглодонные пробирки объемом 5 мл. Затем клетки окрашивали в отношении CD3e-BV421 (клон 145-2C11, BD Biosciences, 562600), CD4-APC (клон RM4.5, BD Biosciences, 553051), CD8-BB700 (клон 53-6.7, BD

Biosciences, 566409) и CD44-BB515 (клон IM7, BD Biosciences, 564587) вместе с красителем жизнеспособности (LiveDead Fixable Aqua, ThermoFisher, L34957). Клетки перемешивали кратковременным встряхиванием и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре, также защищая от света. После окрашивания эритроциты лизировали 3 мл лизирующего буфера ACK (ThermoFisher, A1049201) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки осаждали центрифугированием, супернатанты удаляли и клетки промывали 3 мл промывочного буфера (1x DPBS + 0,5% BSA). Промытые клетки осаждали центрифугированием, а супернатанты удаляли. Клеточные осадки ресуспендировали путем кратковременного встряхивания и фиксировали 100 мкл 2% формальдегида в PBS и хранили в темноте при 4 °C до сбора данных.

[00125] Данные получали на приборе LSRFortessa (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США). Собирали сто тысяч событий, и после сбора данных выполняли компенсацию. Файлы FCS анализировали с применением программного обеспечения WinList версии 8.0 (Verity Software House). Клетки иерархически разделяли на основе отдельных событий (площадь прямого рассеяния по сравнению с высотой) и лимфоцитов (площадь прямого рассеяния по сравнению с площадью бокового рассеяния). Отбирали CD3+ события и из них отбирали CD4+ и CD8+ Т-клетки. Регистрировали процент положительных, а также абсолютные количества в этих популяциях, и, наконец, экспрессию CD44 и абсолютные количества регистрировали для каждой подгруппы Т-клеток.

[00126] На Фиг. 3 изображен процент лимфатических клеток в суспензии отдельных клеток всех клеток селезенки мышей в возрасте 113 недель на момент совместного введения Prevnar13 и энтолимода (в дозах 0,1 мкг/мышь и 1,0 мкг/мышь) или PBS. На Фиг. 4a-b изображен как (a) процент, так и (b) общее количество лимфатических клеток в суспензии отдельных клеток клеток селезенки мышей в возрасте 73 недель на момент совместного введения Prevnar13 и энтолимода (в дозах 0,1 мкг/мышь и 1,0 мкг/мышь) или PBS. На Фиг. 5a-e изображены проценты и количество различных Т-клеточных маркеров (например, CD8-, CD4+ и CD44+) в суспензии отдельных клеток из клеток селезенки мышей, возраст которых составлял 30 недель во время совместного введения Prevnar13 и энтолимода (в дозе 0,1 мкг/мышь и 1,0 мкг/мышь) или PBS.

[00127] **Пример 3: Совместное введение энтолимода с вакциной повышает эффективность вакцинации, несмотря на различные пути введения и составы**

[00128] Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить, зависит ли эффект энтолимода в качестве иммуностимулятора от пути введения и/или используемой лекарственной формы.

[00129] Проводили сравнение эффективности иммунизации самцов мышей NIH Swiss среднего возраста (возраст 73 недели) вакциной Tdap при введении вакцины отдельно или в комбинации с энтолимодом, доставляемым разными путями и в разных формах: путем внутримышечной инъекции, смешанной с вакциной; путем подкожной инъекции; или путем подкожной инъекции, смешанной с адъювантом (Imject Alum, Thermo Scientific).

[00130] Boostrix представляет собой вакцину Tdap, которую применяли. Boostrix представляет собой одобренную FDA вакцину, применяемую для защиты людей от столбняка, дифтерии и ацеллюлярного коклюша. Вакцину Tdap вводили мышам в этом эксперименте в количестве одной четвертой от утвержденной дозы для человека. На Фиг. 6 изображена схематическая иллюстрация графика иммунизации. Мышей иммунизировали в день 1 эксперимента и выполняли бустерную иммунизацию в день 32. Образцы сыворотки крови собирали в день 0 (исходный уровень), день 14, день 28 и день 46.

[00131] Титры специфичных к столбняку антител IgG в образцах сыворотки крови, собранных в ходе эксперимента, измеряли посредством ELISA. Данные, представленные на Фиг. 7, демонстрируют, что вакцинация Tdap мышей среднего возраста была эффективной и что введение энтолимода вместе с вакциной значительно повышало эффективность вакцинации в около 2 раза ($P = 0,015$ на основе однофакторного критерия ANOVA) по сравнению с введением вакцины в отдельности. Также обнаружено, что положительный эффект энтолимода не зависел ни от способа введения энтолимода, ни от присутствия квасцов в качестве адъюванта.

[00132] Проводили сравнение между эффективностью иммунизации мышей-самцов старческого возраста (в возрасте 83 недель) вакциной Prevnar13, когда вакцину вводили через 3 дня, через 7 дней или через 28 дней после подкожного введения энтолимода. В частности, мыши в возрасте 83 недель получали 0,3 мкг энтолимода подкожно и их вакцинировали вакциной Prevnar13 через 3 дня, 7 дней или 28 дней (обозначены как «+(3)», «+(7)» и «+(28)»). Контрольные группы получали только вакцину (обозначена знаком «(-)») или только энтолимод (обозначен знаком «+(0)»). Все группы получили бустерную вакцинацию (только инъекцию вакцины) через 14 дней после первоначальной вакцинации. Сыворотку крови собирали через 14 дней после первоначальной вакцинации (до бустерной вакцинации) и через 14 дней после бустерной вакцинации (после бустерной

вакцинации). Титры IgG измеряли с использованием коммерческого набора ELISA для IgG. На Фиг. 8 изображены повышенные показатели титра IgG после бустерной вакцинации в группах введения вакцины +3 дня и +7 дней по сравнению с контрольными группами.

[00133] **Пример 4: Иммуногенность, фармакодинамика и безопасность совместного введения энтолимода с противогриппозной вакциной у пациентов старческого возраста**

[00134] Проводили рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с однократным введением в последовательных группах и ранжированием доз, в котором оценивали иммуногенность, фармакодинамику и безопасность энтолимода в популяции лиц старческого возраста (старше 65 лет), вакцинированной против гриппа.

[00135] Основные цели исследования состоят из трех частей: (1) оценить эффект повышения дозы энтолимода на повышение иммуногенности противогриппозной вакцины в популяции лиц старческого возраста (≥65 лет); (2) охарактеризовать профиль безопасности энтолимода в популяции лиц старческого возраста (≥65 лет), вакцинированной против гриппа; и (3) оценить фармакодинамический эффект энтолимода в отношении иммунологического статуса, индекса уязвимости (FI) и качества жизни (QoL).

Общая схема исследования

[00136] В общей сложности 100 человек рандомизировали в одну из четырех групп лечения (плацебо и три группы энтолимода с возрастающей дозой).

[00137] После предоставления письменного информированного согласия субъекты проходят скрининг истории болезни, физикальное обследование, оценки жизненно важных показателей, лабораторные исследования и оценки электрокардиограммы (ECG) в течение 7 дней до введения исследуемого лекарственного средства и вакцинации против гриппа.

[00138] Подходящие субъекты получают вакцину против гриппа (Fluzone, высокодозовая расщепленная вирионная противогриппозная вакцина, Sanofi Pasteur) и однократную внутримышечную (IM) инъекцию исследуемого лекарственного средства (энтолимод или плацебо). Для оценки безопасности включали три последовательные когорты субъектов при постепенно возрастающих дозах энтолимода 1 мкг, 3 мкг и 10 мкг. Первоначальную оценку безопасности проводят у первых 4 субъектов (3 получают энтолимод и 1 получает плацебо) в каждой группе дозы. Если ≤ 1 субъект испытывает

дозолимитирующую токсичность (DLT) в течение 7 дней после вакцинации, продолжается возрастание дозы для этой группы путем включения в общей сложности 25 субъектов (20 для получения энтолимода и 5 для получения плацебо). Возрастание дозы происходит поэтапно до следующей запланированной дозы после завершения включения в исследование в предыдущей группе. Если ≥ в группе дозы наблюдаются 2 DLT, информация об исследовании этих индивидуумов будет раскрыта. Если обнаружится, что субъекты с DLT получали исследуемое лекарственное средство энтолимод, комитет по этике клинических испытаний будет привлечен для оценки исследования и принятия решения о продолжении введения доз субъектам.

[00139] Выполняется отсылка на Руководство по отраслевой шкале оценки токсичности для здоровых лиц взрослого возраста и подростков-добровольцев, участвующих в профилактических клинических испытаниях вакцин, для оценки тяжести побочных явлений (AE) и отклонений лабораторных исследований, где это применимо. На основании известного профиля безопасности энтолимода ожидаются гриппоподобные симптомы. Ожидается снижение артериального давления, повышение частоты сердечных сокращений, повышение активности печеночных трансаминаз, гипергликемия и гипофосфатемия. Дозолимитирующая токсичность (DLT) определяется как любое из нежелательных явлений, возникающих в результате лечения (TEAE), или отклонений лабораторных исследований, возникающих в результате лечения, на основании здравого клинического суждения исследователя и независимого монитора безопасности.

[00140] Субъектов оценивают в исследовательском центре в день введения исследуемого лекарственного средства (день 1), в течение ≥ 6 часов (2 часа, 4 часа и 6 часов), затем в неделю 1 и 4, и затем в месяцы 1, 2, 6 и 12. Между месяцами 2 и 6 и 6 и 12 сообщают о нежелательных явлениях, а возникновение респираторных инфекций оценивают с помощью телефонного интервью. Для описания безопасности. фармакодинамики и иммуногенности лекарственных средств выполняют оценки нежелательных явлений, основных показателей жизнедеятельности/насыщения кислородом, параметров клинического биохимического анализа крови и гематологического анализа крови, ECG, цитокинов плазмы крови, лейкоцитов, циркулирующих антител к A/H1N1, антител к A/H3N2 и антител к B к гриппу в сыворотке крови, в том числе результаты клеточного иммунного ответа.

Введение лекарственных средств

Исследуемые лекарственные формы, сила и стабильность

[00141] Исследуемые лекарственные средства (энтолимод и плацебо) изготавливают в соответствии с действующей надлежащей производственной практикой (cGMP).

[00142] Энтолимод выпускается в виде жидкости для внутримышечных (IM) инъекций в предварительно заполненных одноразовых флаконах объемом 2 мл, содержащих 50 мкг энтолимода в 0,5 мл (концентрация 100 мкг/мл) состава. Состав включает фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 0,1% полисорбата 80 (Tween 80).

[00143] Также предусмотрено соответствующее плацебо. Плацебо характеризуется тем же составом наполнителя, что и активная лекарственная форма (т.е. PBS, содержащий 0,1% Tween 80), и разливается в одноразовые флаконы на 2 мл того же типа (0,5 мл на флакон).

[00144] Исследуемое лекарственное средство и плацебо хранят при температуре -70 ± 10 °C. После размораживания лекарственное средство хранят в холодильнике и вводят в течение 8 часов.

Инъекция исследуемых лекарственных средств

[00145] Однократную IM инъекцию исследуемого лекарственного средства (энтолимод или плацебо) вводят каждому субъекту утром после вакцинации, в день 1 (следует ввести в течение 1 минуты после вакцинации против гриппа в том же месте). Соответствующее количество исследуемого лекарственного средства в асептических условиях отбирают из необходимого количества флаконов с исследуемым лекарственным средством в туберкулиновый шприц объемом 1 мл, откалиброванный по 10 мкл. Лекарственное средство вводят из шприца через 1,5-дюймовую иглу 25-го калибра под углом 90° к поверхности кожи в дельтовидную мышцу между акромиональным отростком и средней подмышечной линией.

Рандомизация и распределение доз

[00146] Исследуемых субъектов рандомизировали в группе введения дозы энтолимода или плацебо; цель заключалась в том, чтобы предоставить одновременно набранную группу контрольных субъектов для обеспечения контекста для результатов, наблюдаемых у субъектов, получающих энтолимод. Специалист по биостатистике исследования предоставляет закодированный список рандомизации фармацевту исследовательского центра с указанием назначений доз для субъектов в каждой группе введения доз. Субъекты и персонал исследовательского центра, участвующие в уходе за субъектами, не осведомлены о назначении исследуемого лекарственного средства (энтолимод по сравнению с плацебо), но не о дозе или объеме инъекции. Учитывая исследовательский

характер исследования, спонсор исследования осведомлен в отношении назначения исследуемого лекарственного средства, но не передает эту информацию персоналу исследовательского центра до тех пор, пока это не будет необходимо для безопасности субъекта или принятия решений о повышении дозы.

[00147] Когорты субъектов последовательно включают в исследование для введения все более высоких уровней начальной дозы. Планируются следующие уровни доз: (1) уровень дозы 1: 1 мкг; (2) уровень дозы 2: 3 мкг; и (3) уровень дозы 3: 10 мкг. Эти дозы находятся в диапазоне доз от 1 мкг до 50 мкг и равны или более чем в пять раз меньше доз, которые ранее оценивали у здоровых субъектов и пациентов с прогрессирующими солидными опухолями.

Первичные конечные точки

[00148] Иммуногенность измеряется в виде первичной конечной точки как доля пациентов, достигших сероконверсии. Сероконверсия в отношении вакцины против вируса гриппа определяется либо четырехкратным повышением титра антител между предварительной вакцинацией и в день 30, либо повышением титра антител от <1:10 до ≥1:40 для предварительной вакцинации и образцов сыворотки крови в день 30.

[00149] Иммуногенность также измеряют в качестве первичной конечной точки по изменениям уровней циркулирующих в сыворотке крови антител к штаммам вируса гриппа A/H1N1, A/H3N2 и B (по оценке с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или ингибирования гемагглютинации (анализ HAI)).

[00150] Безопасность измеряют в качестве первичной конечной точки в виде нежелательных явлений, возникающих при лечении (TEAE); отклонений лабораторных исследований; изменений насыщения кислородом и жизненно важных показателей, нежелательных данных электрокардиограммы (ECG).

Вторичные конечные точки

[00151] Фармакодинамика и клеточные иммунные ответы на вакцинацию против гриппа оценивают в качестве вторичных конечных точек. Например, эти вторичные конечные точки измеряют следующим образом: (1) время до начала и количество инфекций верхних дыхательных путей, в том числе (без ограничения) инфекции вируса гриппа (как указано в самоотчетах субъектов); (2) изменения концентрации циркулирующих цитокинов плазмы крови, в том числе (но без ограничения): IL-6 и G-CSF в качестве фармакодинамических индикаторов активности энтолимода (измеренных посредством ELISA); (3) изменения 10 цитокиновых/хемокиновых медиаторов

адаптивной иммунной функции (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 и TNF-α) в супернатантах культуры PBMC через 0 и 24 часа после стимуляции вирусом гриппа (A/H1N1, A/H3N2 и B), обнаруженные посредством наборов для иммуноанализа человека Meso Scale Discovery, с провоспалительной панелью V-PLEX; (4) изменения количественной оценки IFNγ положительных клеток в качестве маркера клеточно-опосредованного иммунитета (CMI) после вакцинации с применением наборов ELISPOT для анализа специфических к вирусу гриппа IFN-γ от R&D Systems; и (5) сравнение между индексом уязвимости (FI) и качеством жизни (QoL) лиц, получающих энтолимод по сравнению с плацебо (в качестве показателей, полученных из анкет пациентов для самозаполнения).

Статистические методы

[00152] Определены соответствующие наборы для анализа данных. Набор для полного анализа включает данные всех рандомизированных субъектов. Набор для анализа безопасности включает данные всех рандомизированных субъектов, получавших исследуемое лекарственное средство (энтолимод или плацебо). Определены поддающиеся оценке наборы для анализа, которые включают данные от субъектов, у которых имеются необходимые исходные данные и измерения во время исследования, для получения интерпретируемых результатов для конкретных параметров, представляющих интерес.

[00153] Данные описывают и обобщают по назначению исследуемого лекарственного средства (энтолимод или плацебо), уровню дозы и временной точке. При необходимости описывают и обобщают изменения от исходного уровня до каждой последующей временной точки. Аналогичным образом, при необходимости, описывают и обобщают самые выраженные изменения по сравнению с исходным уровнем во время исследования. Таблицы сдвига или графические методики (например, гистограммы, линейные графики) используют, когда такие способы являются подходящими и информативными. Описательные резюме включают размер выборки; среднее; среднеквадратичное отклонение; 95% доверительные интервалы (CI) для среднего, медианы, минимума и максимума для непрерывных переменных и подсчетов; проценты; и 95% CI в процентах для категориальных переменных.

[00154] Анализы основаны на наблюдаемых данных, если не указаны способы обработки отсутствующих данных. Если существует значительная степень несоответствия нормальному распределению, анализ может быть выполнен на логарифмически преобразованных данных или могут быть применены непараметрические критерии, в зависимости от ситуации.

[00155] Статистическое тестирование является двусторонним при номинальном уровне значимости 0,05. Учитывая исследовательский характер данного исследования, поправки на множественные сравнения не применяются.

[00156] На основе полного набора анализов описывается информация о демографических данных субъекта, сопутствующих заболеваниях, истории лечения и других исходных характеристиках.

[00157] Описаны и обобщены введение исследуемого лекарственного средства, сопутствующее применение лекарственных средств, применение поддерживающей терапии, нежелательные явления, отклонения лабораторных исследований, показатели жизненно важных функций/насыщение кислородом, масса тела, вирусологические данные, качество жизни и статус индекса уязвимости. Для анализа безопасности нежелательные явления классифицируют с использованием Медицинского словаря регуляторной деятельности (MedDRA). Тяжесть AE оценивают исследователем в соответствии с Руководством по отраслевой шкале оценки токсичности для здоровых взрослых и подростков-добровольцев, участвующих в клинических испытаниях профилактических вакцин. Сопутствующее применение лекарственных средств кодируется с использованием Словаря лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения (WHODRUG) в кодах анатомо-терапевтическо-химической классификации (ATC); эти описания данных особенно сосредоточены на поддерживающих лекарственных средствах и уходе, предоставляемом в ответ на любые побочные эффекты, вызванные исследованием, и на средства терапии GVHD. Для оценки посредством ECG QT-интервалов применяется коррекция как по методу Базетта, так и по методу Фридерициии, и данные суммируются по категориям классификации CTCAE с точки зрения абсолютного изменения QTc и максимального изменения QTc по сравнению с исходным уровнем.

[00158] Фармакодинамические показатели перечислены и обобщены с применением соответствующих графических и табличных методов. Статистический анализ, оценивающий фармакодинамические параметры, проводится с использованием контрастов в контексте ковариационного анализа (ANCOVA).

[00159] Количество случаев инфекции верхних дыхательных путей, время до начала и продолжительность активной вирусной инфекции отмечают с использованием соответствующих табличных методов и анализируют на основе статистического ANCOVA среди групп исследуемого лекарственного средства и плацебо.

[00160] Используя соответствующие методики регрессии или стратификации, исследуют связи между характеристиками субъектов (например, пол, раса, возраст, масса тела, доза) и показателями результатов (например, фармакодинамическими параметрами). Аналогичным образом оценивают связи между показателями результатов (например, взаимосвязи между фармакодинамическими параметрами).

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[00161] Хотя настоящее изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дальнейшие модификации, и настоящая заявка предназначена для охвата любых вариаций, путей применения или адаптаций настоящего изобретения, следуя, в целом, принципам настоящего раскрытия и включая такие отклонения от настоящего раскрытия, которые входят в известную или обычную практику в области техники, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, изложенным в данном документе выше и далее в объеме прилагаемой формулы изобретения.

[00162] Специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления, описанных конкретно в данном документе. Такие эквиваленты охватываются в объеме следующей формулы изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[00163] Все патенты и публикации, на которые делается ссылка в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[00164] Публикации, обсуждаемые в данном документе, предназначены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в данном документе не должно истолковываться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранней датой в силу предшествующего изобретения.

[00165] В контексте данного документа все заголовки предназначены только для организации и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Содержание любого отдельного раздела может быть одинаково применимо ко всем разделам.

[00166] В контексте данного документа все заголовки предназначены только для организации и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего

изобретения. Содержание любого отдельного раздела может быть одинаково применимо ко всем разделам.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения эффективности вакцины у пациента, причем указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного или синтетического агониста TLR5 и антигена, стимулирующего иммунный ответ против нарушения,

при этом иммунный ответ усиливается или стимулируется у пациента по сравнению с иммунным ответом пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

2. Способ повышения эффективности вакцины у пациента, причем указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, антигена, который стимулирует иммунный ответ против нарушения, где указанный пациент получал или получает рекомбинантный или синтетический агонист TLR5,

при этом иммунный ответ усиливается или стимулируется у пациента по сравнению с иммунным ответом пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

3. Способ повышения эффективности вакцины у пациента, причем указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, рекомбинантного или синтетического агониста TLR5, и при этом указанный пациент получал или получает антиген, стимулирующий иммунный ответ против нарушения,

при этом иммунный ответ усиливается или стимулируется у пациента по сравнению с иммунным ответом пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

4. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный иммунный ответ усиливается или стимулируется до того, как пациенту вводят антиген.

5. Способ по любому из пп. 1–3, причем указанный иммунный ответ усиливается или стимулируется после введения антигена пациенту.

6. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем у указанного пациента имеется стареющая иммунная система.

7. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем у указанного пациента имеется нарушенная иммунная система.

8. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем у указанного пациента имеется ослабленная иммунная система.

9. Способ по п. 1, причем возраст указанного пациента является средним.

10. Способ по п. 9, причем возраст указанного пациента составляет от около 36 до около 64 лет.

11. Способ по п. 1, причем указанный пациент является пациентом старческого возраста.

12. Способ по п. 11, причем возраст указанного пациента составляет около 65 лет или старше.

13. Способ по п. 12, причем у указанного пациента имеется возрастное нарушение иммунной системы.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем биологический пол указанного пациента является мужским.

15. Способ по любому из пп. 1–13, причем биологический пол указанного пациента является женским.

16. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный агонист TLR5 представляет собой энтолимод или его производное.

17. Способ по п. 16, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1.

18. Способ по п. 17, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 1.

19. Способ по п. 16, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 4.

20. Способ по п. 19, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

21. Способ по п. 16, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с одной из SEQ ID NO: 2–3, 5–26 и 28.

22. Способ по п. 21, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO: 2–3, 5–26 и 28.

23. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанные уровни титра антигенспецифических антител выше по сравнению с уровнями титра антигенспецифических антител у пациентов, которым не вводили агонист TLR5.

24. Способ по п. 23, причем указанные уровни титра антигенспецифических антител по меньшей мере в около 2 раза выше по сравнению с уровнями титра антигенспецифических антител у пациентов, которым не вводили агонист TLR5.

25. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем врожденный иммунный ответ указанного пациента повышен по сравнению с врожденным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5.

26. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем адаптивный иммунный ответ указанного пациента повышен по сравнению с адаптивным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5.

27. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем врожденный иммунный ответ и адаптивный иммунный ответ указанного пациента повышены по сравнению с врожденным и адаптивным иммунным ответом пациента, которому не вводили агонист TLR5.

28. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем популяция(-и) Т-клеток указанного пациента увеличивается(-ются) и/или восстанавливается(-ются) по сравнению с популяциями Т-клеток пациента, которому не вводили агонист TLR5.

29. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем количество указанных Т-клеток пациента, в том числе Т-клеток, выбранных из одной или нескольких эффекторных CD4+ Т-клеток, эффекторных CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток памяти, CD8+ Т-клеток памяти, CD4+ Т-клеток центральной памяти, CD8+ Т-клеток центральной памяти, естественных Т-клеток-киллеров, CD4+ клеток-хелперов и CD8+ цитотоксических клеток, повышается и/или восстанавливается по сравнению с популяциями Т-клеток пациента, которому не вводили агонист TLR5.

30. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный способ приводит к снижению дозы вакцины по сравнению с дозой вакцины пациента, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

31. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный способ приводит к снижению частоты введения вакцины по сравнению с частотой введения вакцины пациенту, которому не вводили рекомбинантный или синтетический агонист TLR5.

32. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный антиген представляет собой составную часть инфекционного агента, выбранного из живого и аттенуированного, убитого, инактивированного и анатоксического инфекционного агента.

33. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный антиген ассоциирован с заболеванием и/или нарушением, выбранным из столбняка, дифтерии, ацеллюлярного коклюша и инвазивной инфекции, вызванной видами пневмококковых бактерий.

34. Способ по п. 33, причем указанная инвазивная инфекция, вызванная видами пневмококковых бактерий, представляет собой пневмонию или менингит.

35. Способ по п. 33, причем указанное заболевание и/или нарушение представляет собой столбняк, дифтерию и/или коклюш.

36. Способ по любому из пп. 1–32, причем указанный антиген ассоциирован с вирусной инфекцией.

37. Способ по п. 36, причем указанная вирусная инфекция представляет собой грипп.

38. Способ по любому из пп. 1–31, причем указанный антиген ассоциирован с одной или несколькими из опухолевой клетки, клетки с поврежденной ДНК и стареющей клетки.

39. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем указанный рекомбинантный агонист TLR5 вводят в дозе от около 0,5 мкг до около 15 мкг.

40. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, причем указанный рекомбинантный агонист TLR5 не вводят без адъюванта.

41. Способ по предыдущему пункту, причем указанный адъювант выбран из одного или нескольких из квасцов, AS04, AS03, гидроксида алюминия, фосфата алюминия и сульфата калия-алюминия.

42. Агонист TLR5 для применения при повышении эффективности вакцины у пациента, содержащий рекомбинантный агонист TLR5 и антиген, который стимулирует иммунный ответ против нарушения,

при этом иммунный ответ усиливается или стимулируется у пациента.

43. Способ повышения эффективности вакцины у пациента старческого возраста с иммунодефицитом, включающий введение пациенту старческого возраста с иммунодефицитом, нуждающемуся в этом, рекомбинантного агониста TLR5 и антигена, который стимулирует иммунный ответ против нарушения,

при этом иммунный ответ усиливается или стимулируется у пациента по сравнению с иммунным ответом пациента, которому не вводили рекомбинантный агонист TLR5,

при этом эффективность вакцины повышается по сравнению с ожидаемым возрастным ответом у пациента старческого возраста, которому не вводили рекомбинантный агонист TLR5.

44. Способ по п. 43, причем указанный возраст пациента составляет около и старше 65 лет.

45. Способ по п. 43, причем у пациента имеется возрастное нарушение иммунной системы.

46. Способ по п. 43, причем биологический пол указанного пациента является мужским или женским.

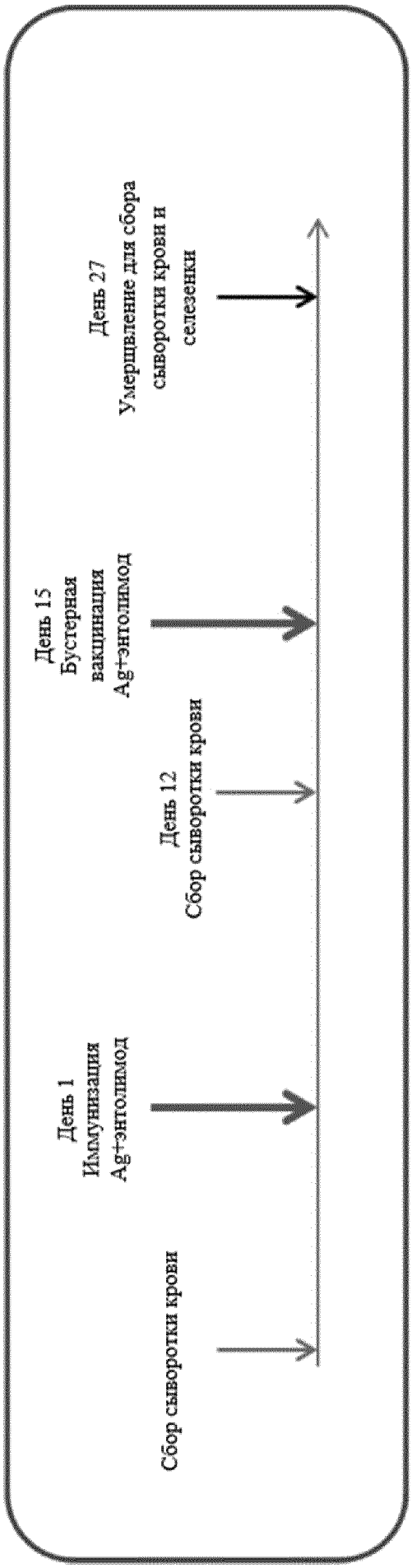
47. Способ по п. 43, причем указанный агонист TLR5 представляет собой энтолимод или его производное,

при этом агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, которая представляет собой SEQ ID NO: 1.

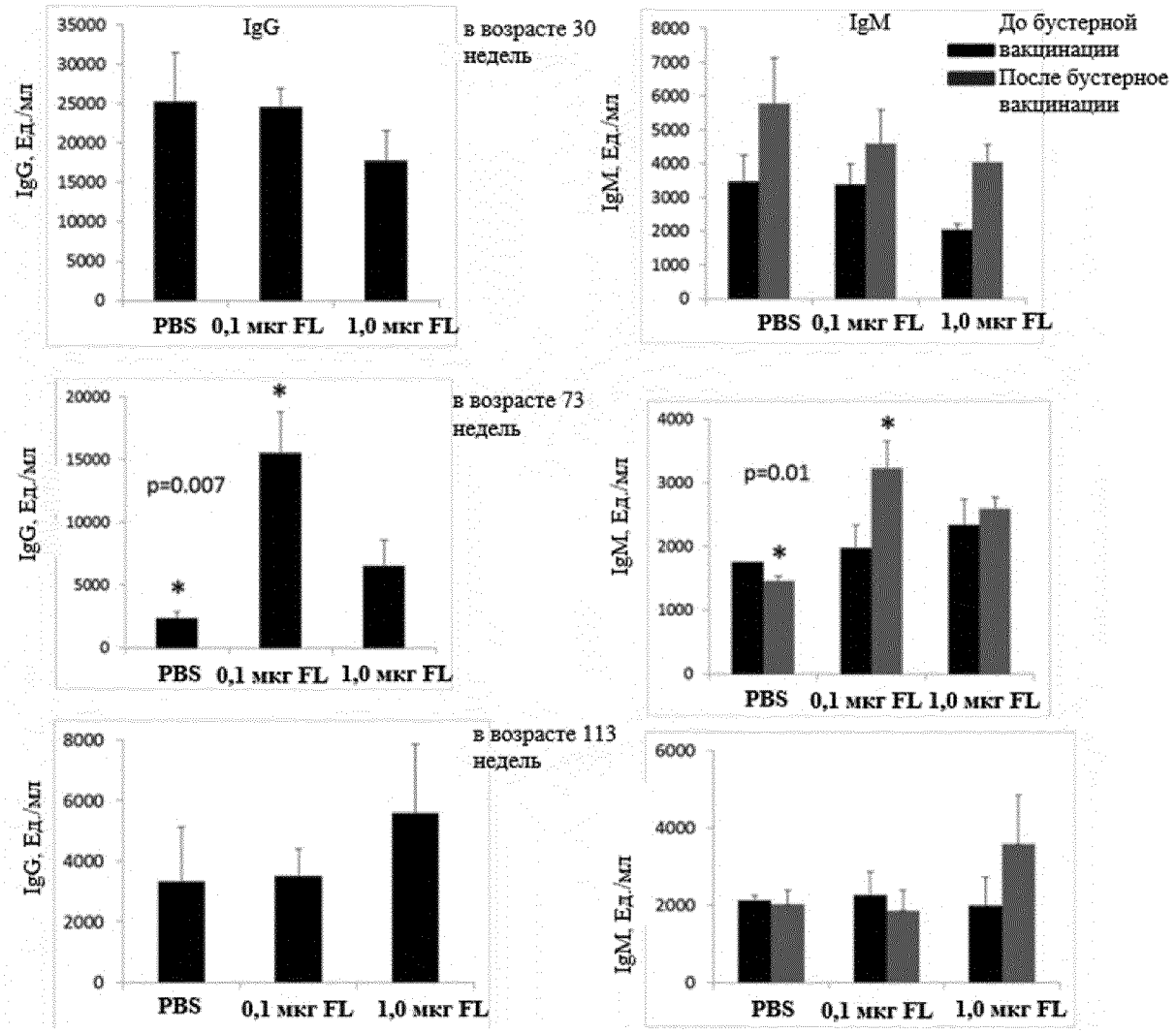
48. Способ по п. 43, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 4.

49. Способ по п. 43, причем указанный агонист TLR5 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с одной из SEQ ID NO: 2–3, 5–26 и 28.

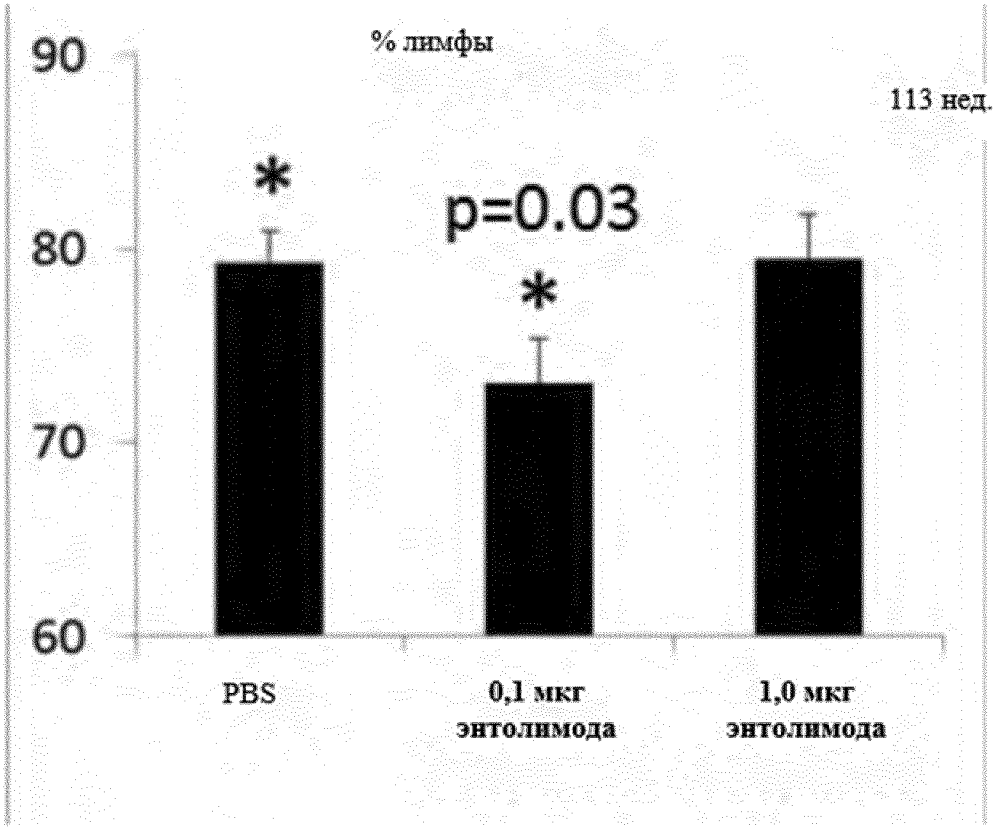
Фиг. 1


Сбор сыворотки крови
День 1
Иммунизация
Ag+энтолимод
День 12
Сбор сыворотки крови
День 15
Бустерная
вакцинация
Ag+энтолимод
День 27
Умерщвление для сбора
сыворотки крови и
селезенки

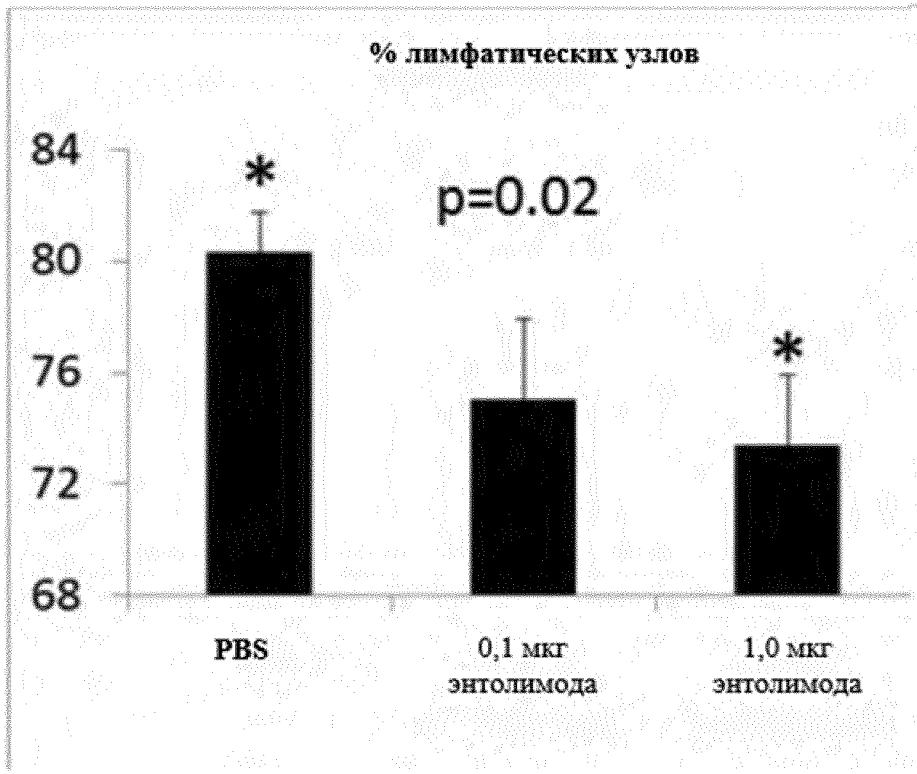
Фиг. 2


IgG
IgM
До бустерной вакцинации
После бустерное вакцинации
IgG, Ед./мл
IgM, Ед./мл
в возрасте 30 недель
в возрасте 73 недель
в возрасте 113 недель
p=0.007
p=0.01
PBS
0,1 мкг FL
1,0 мкг FL

Фиг. 3

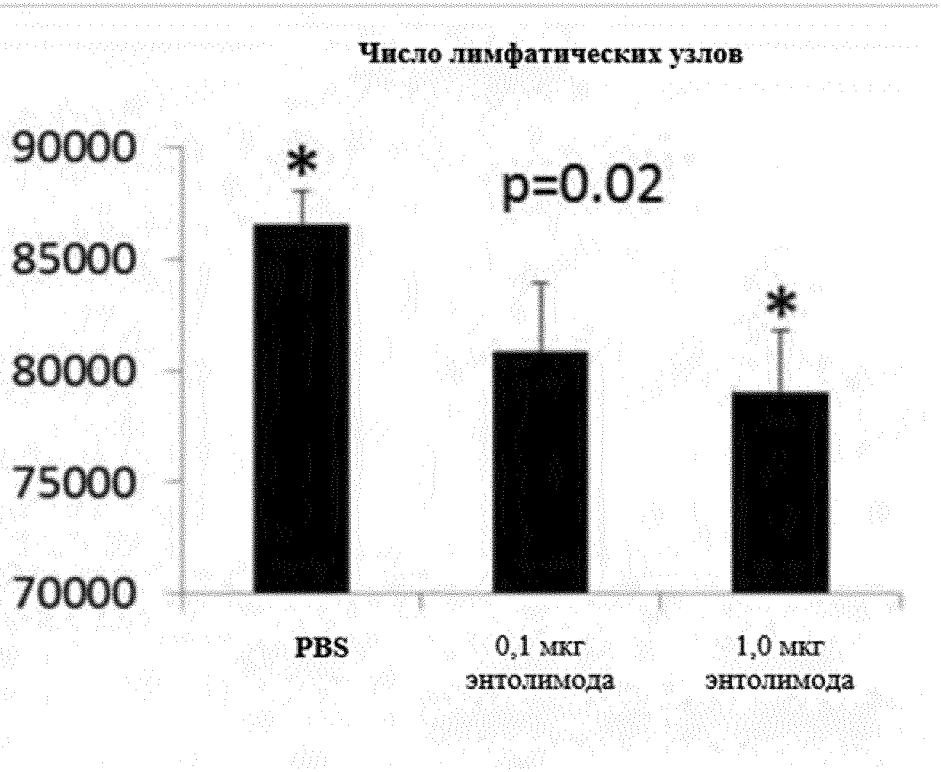

% лимфы
113 нед.
90
80
70
60
*
p=0.03
*
PBS
0,1 мкг энтолимода
1,0 мкг энтолимода

Фиг. 4A

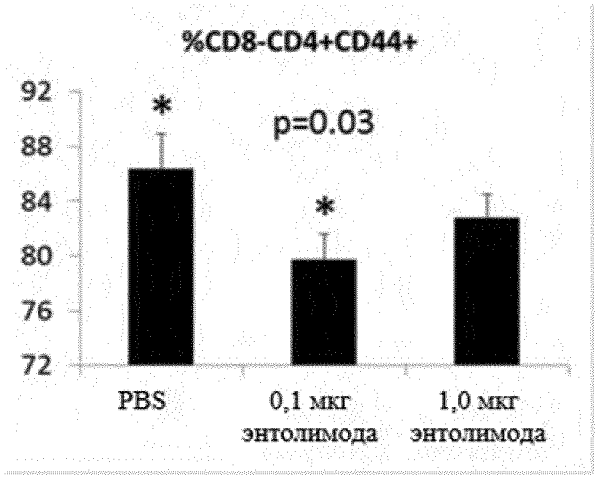


Фиг. 4B

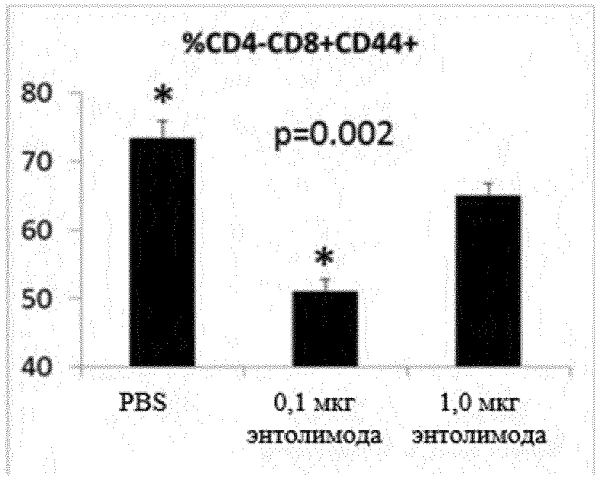
73 нед.



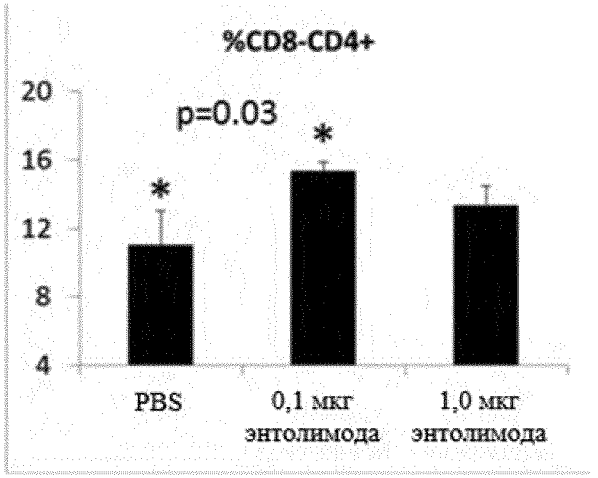
Фиг. 5A



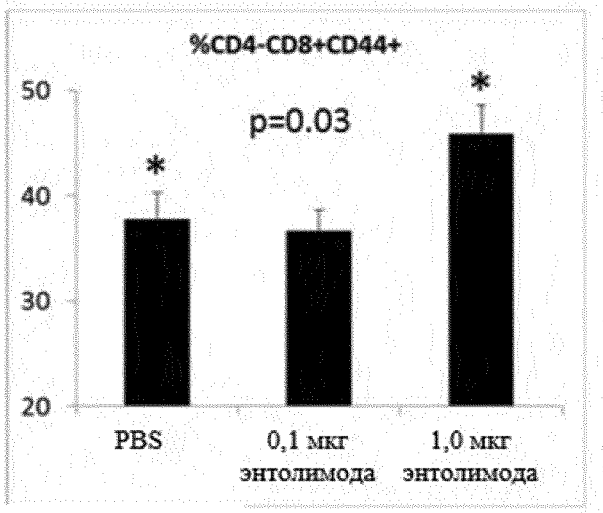
Фиг. 5B



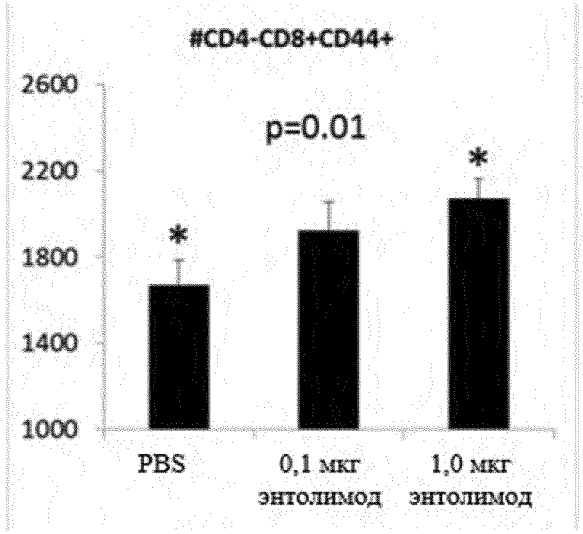
Фиг. 5C



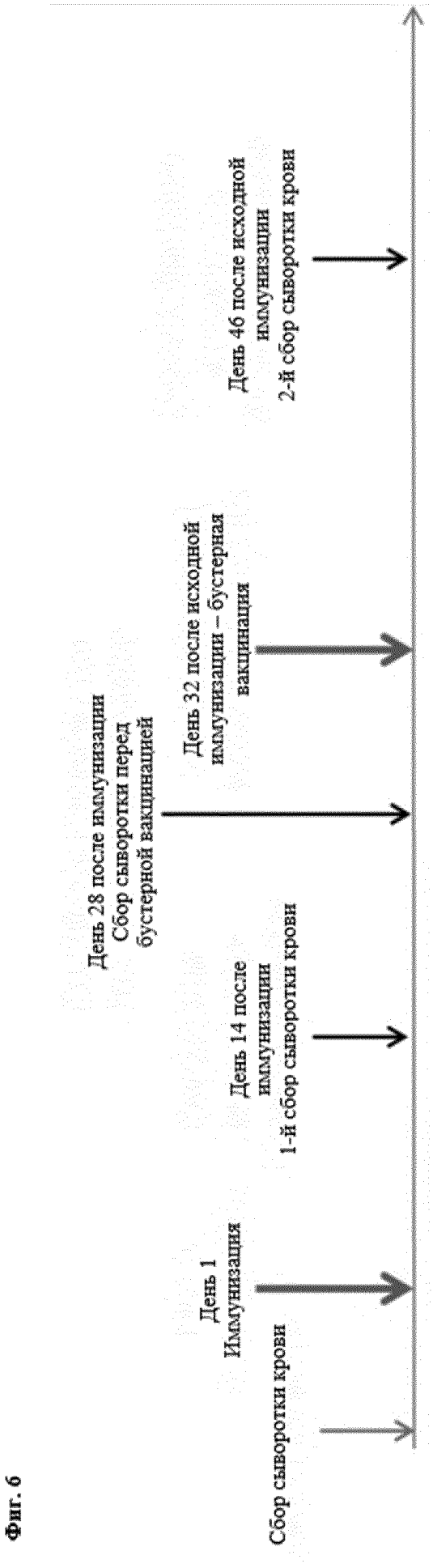
Фиг. 5D



Фиг. 5E

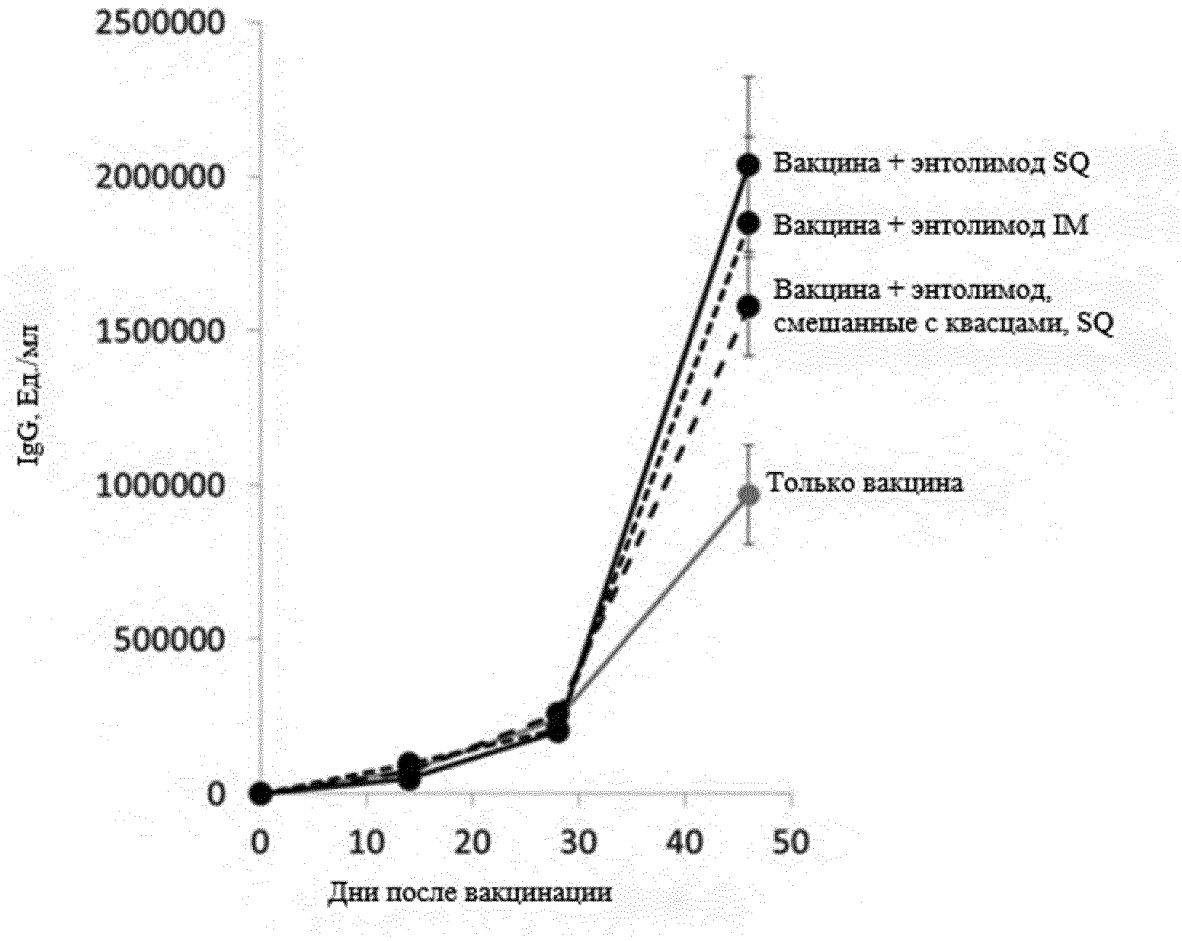


30 нед.

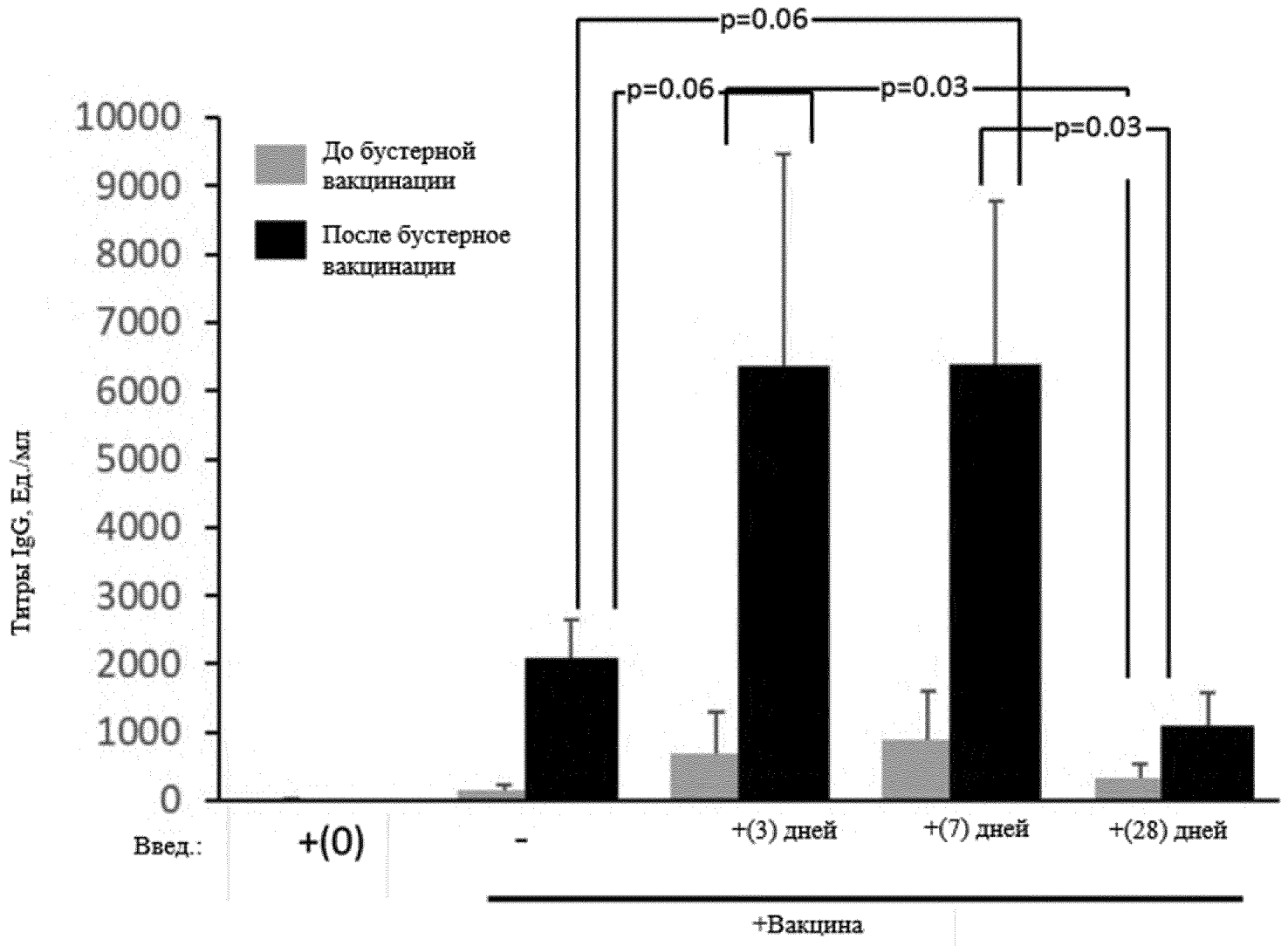

Сбор сыворотки крови
День 1
Иммунизация
День 14 после
иммунизации
1-й сбор сыворотки крови
День 28 после иммунизации
Сбор сыворотки перед
бустерной вакцинацией
День 32 после исходной
иммунизации – бустерная
вакцинация
День 46 после исходной
иммунизации
2-й сбор сыворотки крови

Фиг. 6

Фиг. 7


2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
IgG, Ед./мл
0
10
20
30
40
50
Дни после вакцинации
Вакцина + энтолимод SQ
Вакцина + энтолимод IM
Вакцина + энтолимод, смешанные с квасцами, SQ
Только вакцина

Фиг. 8


p=0.06
p=0.06
p=0.03
p=0.03
До бустерной вакцинации
После бустерное вакцинации
Титры IgG, Ед./мл
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Введ.:
+(0)
-
+(3) дней
+(7) дней
+(28) дней
+Вакцина