

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292929** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.05

(22) Дата подачи заявки
2021.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 5/48 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

**(54) ЛИПОСОМНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ
ПАТОГЕННОЙ ИНФЕКЦИИ НА РАННЕЙ СТАДИИ**

(31) 20169618.4; 20201268.8

(32) 2020.04.15; 2020.10.12

(33) EP

(86) PCT/EP2021/059807

(87) WO 2021/209562 2021.10.21

(71) Заявитель:

СТАТЕНС СЕРУМ ИНСТИТУТ (DK)

(72) Изобретатель:

**Фоллманн Франк, Андерсен Петер,
Дитрих Йес, Кристенсен Деннис (DK)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к липосомной композиции для применения в качестве лекарственного средства. В частности, настоящее изобретение относится к липосомной композиции для применения в целях профилактики или лечения патогенной инфекции на ранней стадии. Более конкретно, липосомную композицию применяют для профилактики или лечения патогенной инфекции в дыхательных путях на ранней стадии, предпочтительно путем интраназального или внутрилегочного введения.

202292929

A1

A1

202292929

**ЛИПОСОМНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ
ПАТОГЕННОЙ ИНФЕКЦИИ НА РАННЕЙ СТАДИИ****Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к липосомной композиции для ее применения в качестве лекарственного средства. В частности, настоящее изобретение относится к липосомной композиции для применения в целях профилактики или лечения патогенной инфекции на ранней стадии. Более конкретно, липосомную композицию применяют для профилактики или лечения на ранней стадии патогенной инфекции дыхательных путей, предпочтительно посредством интраназального или внутрилегочного введения.

Предпосылки создания изобретения

Врожденная иммунная система устроена таким образом, что она действует сразу же после контактирования с появляющимися патогенами. За счет усиления врожденного иммунного ответа в дыхательных путях может быть достигнута быстрая защита от инфекции патогенами дыхательных путей. Это особенно актуально для индивидуумов с ослабленным/сниженным иммунитетом дыхательных путей. В отличие от адаптивного иммунного ответа, активация врожденного иммунитета обеспечивает широкую защиту от многих патогенов и такая иммунная защита не подвергается риску снижения из-за мутационных изменений патогенов.

Путем усиления такого иммунного ответа в дыхательных путях, особенно у групп высокого риска со сниженным иммунитетом дыхательных путей, можно спасти жизнь.

Одним из конкретных примеров является коронавирус SARS-CoV-2, вызывающий заболевание CoVid-19. Коронавирусы действуют по нескольким механизмам, позволяющим обойти врожденную иммунную систему и даже поставить ее под угрозу, что приводит к инфицированию с последующим вырабатыванием менее эффективного адаптивного иммунитета¹. Поэтому, крайне важно предотвратить такое «ускользание» от иммунного ответа посредством укрепления врожденной первой линии защиты. SARS-CoV-2 очень похож на SARS-CoV-1. Исследования инфицирования вирусом SARS-CoV-1 ясно продемонстрировали важность врожденного иммунитета. Фактически, даже при полном отсутствии Т- и В-клеток, иммунная система животных могла бороться с инфекцией. Такой контроль требует наличия врожденного иммунитета, способного продуцировать различные цитокины, а в частности, интерфероны типа I^{2,3}. В соответствии с этим, другие исследования показали, что как профилактические, так и постэкспозиционные стратегии, включающие только стимуляцию врожденного иммунитета, способны предотвращать инфекции у животных-моделей¹. Ключевым компонентом защиты хозяина от вирусных инфекций является ловушко-подобный рецептор-3 (TLR-3), который активируется дцРНК вирусов и запускает продуцирование интерферонов типа I⁴. Интересно отметить, что обработка мышей агонистами TLR3 через дыхательные пути снижало титры легочных вирусов, вызываемых инфекцией дыхательных путей пятью различными штаммами вируса

гриппа^{5,6}. У мышей с моделью SARS, основанной на адаптированном у мышей высоковирулентном штамме коронавируса SARS, препарат агониста TLR3 показал впечатляющий уровень противовирусной активности. Этот препарат под названием Амплиген недавно прошел клинические испытания с участием человека, которому осуществляли внутривенное введение¹¹. У людей, экспериментальное введение агониста TLR3 фазы I/II также защищало от инфекции дыхательных путей как риновирусом, так и вирусом гриппа⁷. Таким образом, стимуляция TLR3 является очень перспективной стратегией повышения врожденного противовирусного иммунитета.

Еще одним ключевым компонентом защиты дыхательных путей от патогенов является рецептор лектина С-типа Mincle, который ассоциируется с врожденной защитой, например, от микобактерий и стрептококков. Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что комбинация агониста Mincle и TLR3 синергически увеличивает способность индуцировать зависимые от интерферона типа 1 ответы CD8-Т-клеток.

Общая гипотеза, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в том, что профилактическое интраназальное или внутрилегочное лечение липосомной композицией согласно изобретению активирует врожденную иммунную систему, включая иммунный ответ слизистых оболочек, и приводит к кратковременной защите от патогенной инфекции, такой как инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, а также другими респираторными патогенами. Это лечение может быть назначено повторно в течение всей эпидемии группам высокого риска, так как оно значительно снижает уровень заболеваемости и препятствует распространению, например, SARS-CoV-2. Кроме того, такое лечение не скомпрометировано какими-либо мутациями в патогене, поскольку оно не является специфичным.

Специалистами Института Statens Serum было разработано несколько вакцинных адъювантов/активаторов врожденного иммунитета на основе технологии CAF® (технологии получения катионной адъювантной композиции), одним из которых является CAF®09b, который в настоящее время проходит испытания с участием человека. Этот препарат проходит испытания в качестве адъюванта, вводимого внутримышечно или внутрибрюшинно в целях индуцирования адаптивного иммунного ответа, опосредованного Т- и В-клетками, против вакцинных антигенов (в настоящее время продолжаются следующие клинические испытания: NCT03412786; NCT03715985, NCT03926728).

CAF®09b содержит врожденный иммуностимулятор MMG (связывающийся с природным рецептором, Mincle) и интерферон типа I, индуцирующий агонист TLR3 poly-I:C. CAF®09b, используемый в качестве парентерального адъюванта, вызывает сильную активацию врожденного иммунитета, но без серьезных побочных эффектов⁸.

Другим членом семейства CAF® является CAF®04, который индуцирует активацию Th1 посредством высвобождения IFN-γ.

Настоящее изобретение сосредоточено на введении липосомных композиций, таких как CAF®04 или CAF®09b, в дыхательные пути с целью активации врожденных иммунных клеток дыхательных путей для защиты от инфекции дыхательных путей патогенами.

Описание сущности изобретения

Интраназальное лечение липосомной композицией, такой как CAF®04 или CAF®09b, активирует врожденную иммунную систему, включая иммунный ответ слизистой оболочки, и обеспечивает кратковременную защиту от инфицирования респираторными патогенами. Это лечение можно проводить неоднократно в течение всей эпидемии, например, для групп высокого риска, и такое лечение значительно снижает уровень заболеваемости и препятствует распространению патогена.

Таким образом, настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA) и по меньшей мере один иммуномодулятор для его применения у индивидуума в качестве лекарственного средства.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA) и по меньшей мере один иммуномодулятор для его применения в целях профилактики или лечения патогенной инфекции дыхательных путей у индивидуума.

Липосомная композиция может также содержать иммуномодулятор, предпочтительно poly(I:C), а более предпочтительно, агонисты STING, такие как cAMP, cGMP, c-di-AMP или c-di-GMP.

Патогенная инфекция может представлять собой вирусную инфекцию дыхательных путей, вызываемую вирусом, который может быть выбран, помимо прочих, из пикорнавируса, риновируса, коронавируса, такого как MERS-коронавирус, SARS-коронавирус, такой как SARS-CoV-2; вируса гриппа; вируса парагриппа человека; респираторно-синцитиального вируса человека; аденовируса; энтеровируса и метапневмовируса.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, патогенная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию верхних дыхательных путей, вызванную бактериями, которые могут быть выбраны из бактерий, которыми являются, но не ограничиваются ими, *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* и микобактерии, такие как *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti* и *Burkholderia Sp.*

Патогенные инфекции, вызываемые вирусами и бактериями дыхательной системы, могут вызывать особенно серьезные заболевания у пожилых и ослабленных пациентов, а также у пациентов с хронической или врожденной дисфункцией дыхательной системы, такой как, но не ограничивающейся ими, астма, кистозный фиброз или хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ).

Соответственно, индивидуум, у которого будет наблюдаться позитивный эффект от лечения согласно изобретению, может иметь хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), астму, кистозный фиброз или другое состояние, которое приводит к нарушению дыхательной функции по сравнению со здоровым индивидуумом.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к устройству для

интраназального введения, содержащему описанную здесь липосомную композицию.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 проиллюстрировано интраназальное лечение липосомной композицией, такой как CAF®09b (содержащей DDA, MMG и poly(I:C)), которая активирует врожденную иммунную систему и обеспечивает кратковременную защиту от инфицирования респираторными патогенами. Это лечение можно проводить неоднократно в течение всей эпидемии, например, для групп высокого риска, и такое лечение значительно снижает уровень заболеваемости и препятствует распространению патогена.

На Фигуре 2 проиллюстрированы приток врожденных иммунных клеток и секреция IFN-альфа/бета в легких мышей, которых обрабатывали или не обрабатывали (+/-) CAF®09b.

На Фигуре 3 проиллюстрирован уровень экспрессии генов выбранных провоспалительных маркеров и маркеров интерферона типа 1 в легких мышей, которых обрабатывали или не обрабатывали (+/-) CAF®09b.

На фигуре 4 проиллюстрирован уровень экспрессии генов выбранных провоспалительных маркеров и маркеров интерферона типа 1 в легких мышей, которых не обрабатывали, или мышей, которых два или четыре раза обрабатывали CAF®09b.

На Фигуре 5 показано изменение массы и выживаемости мышей, которых обрабатывали или не обрабатывали (+/-) CAF®09b в течение определенного периода времени после инфицирования вирусом гриппа.

На фигуре 6 показано продуцирование антител IgG в крови мышей как показано на фигуре 5.

На фигуре 7 проиллюстрировано изменение выживаемости, вирусной нагрузки и массы мышей, которых обрабатывали или не обрабатывали (+/-) CAF®04 в течение определенного периода времени, и которых обрабатывали агонистом STING отдельно или в комбинации.

На фигуре 8 проиллюстрировано изменение выживаемости, вирусной нагрузки и массы мышей, которых обрабатывали или не обрабатывали (+/-) CAF®09b в течение определенного периода времени, и которых обрабатывали агонистом STING отдельно или в комбинации.

На фигуре 9 проиллюстрирована репликация вируса в носовой полости мышей, которых обрабатывали или не обрабатывали (+/-) CAF®04, CAF®09b и агонистом STING отдельно или в комбинации.

На фигуре 10 проиллюстрировано изменение массы у хомячков, инфицированных SARS-CoV-2, а также обработанных или не обработанных (+/-) CAF®09b или контрольным образцом.

Далее приводится более подробное описание настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Определения

Перед подробным обсуждением настоящего изобретения, будут определены

нижеследующие термины и номенклатура:

Индивидуум

Термин «индивидуум» включает людей всех возрастов, других приматов (например, собакоподобных обезьян, макак-резусов); млекопитающих в целом, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, козы; кошек и/или собак; и/или птиц. Предпочтительным индивидуумом является человек.

Термин «индивидуум» также включает здоровых индивидуумов, а в частности, здоровых индивидуумов, подвергающихся воздействию патогенов и нуждающихся в защите от инфекции, таких как медицинские работники.

Патогенные инфекции, вызываемые вирусами и бактериями дыхательной системы, могут быть особенно тяжелыми у пожилых и ослабленных пациентов, а также у пациентов с хронической или врожденной дисфункцией дыхательной системы, такой как астма, кистозный фиброз или хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ).

Пациенты с раком легкого также могут получать липосомную композицию согласно изобретению. Таковыми пациентами также являются курильщики в прошлом или курильщики, которые в настоящее время курят сигареты или употребляют другие табачные изделия.

Вышеупомянутые индивидуумы являются восприимчивыми к инфекциям верхних дыхательных путей, а поэтому введение раскрытой здесь композиции потенциально может предотвратить появление симптомов простуды или простудных заболеваний и, таким образом, предотвратить обострение основных заболеваний и симптомов.

Введение

Термин «введение» в контексте настоящего изобретения означает введение различными способами, а именно, путем системного введения, такого как инъекция, в системах доставки, либо путем местного введения, интрадермального введения, (интра)назального введения, подъязычного введения или введения в легкие.

Липосомную композицию согласно изобретению обычно вводят (интра)назально в пределах от одного раза в день до одного или двух раз в неделю, до одного раза в две недели или до одного или двух раз в месяц.

Термины «введение в носовую полость», «назальное введение», или «интраназальное введение» являются синонимами и относятся к доставке липосомной композиции в слизистую оболочку носа индивидуума таким образом, чтобы содержимое липосомной композиции всасывалось непосредственно в ткани носа или верхних дыхательных путей.

Липосомная композиция согласно изобретению может быть также введена путем внутрилегочного введения. Термин «внутрилегочный» относится к введению через нос или рот индивидуума для доставки липосомной композиции в альвеолярные ткани легких, где она всасывается в организм. Внутрилегочное введение может представлять собой прямую ингаляцию липосомной композиции, такой как порошок, или ингаляцию аэрозоля, содержащего эту композицию. Рассматриваемая здесь липосомная композиция согласно

изобретению может быть введена путем совместного интраназального и внутривнегочного введения, при этом, часть липосомной композиции доставляется на слизистую оболочку носа, а часть доставляется в альвеолярные ткани легких.

Инфекции

Термин «инфекция» в контексте настоящего изобретения означает инфекцию дыхательных путей, таких как верхние или нижние дыхательные пути, вызываемую патогеном, таким как вирус или бактерия.

Вирусная инфекция может представлять собой коронавирусную инфекцию человека или инфекцию вирусом гриппа. Другие вирусные инфекции могут быть вызваны пикорнавирусом (например, риновирусом), вирусом парагриппа человека, респираторно-синцитиальным вирусом человека, аденовирусом, энтеровирусом или метапневмовирусом.

Бактериальная инфекция дыхательных путей может быть вызвана бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, и микобактерий, таких как *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, и *Burkholderia Sp.*

«Профилактика» патогенной инфекции, состояния или заболевания относится к введению липосомной композиции, которая в соответствии со статистической выборкой снижает частоту возникновения инфекции, состояния или заболевания у индивидуума, получающего лечение, по сравнению с индивидуумом, который не получал лечение, или задерживает начало развития или уменьшает тяжесть одного или нескольких симптомов инфекции, состояния или заболевания по сравнению с контрольным индивидуумом, который не получал лечения.

DDA

Одним из конкретных эффективных типов адъювантов, стимулирующих клеточно-опосредованный иммунный ответ, является класс четвертичных аммониевых соединений, таких как катионное поверхностно-активное вещество диметилдидециламмоний (DDA). DDA представляет собой синтетическое амфифильное соединение, содержащее гидрофильную положительно заряженную головную группу диметиламмония и две длинные гидрофобные алкильные цепи. В водной среде, молекулы DDA подвергаются самосборке с образованием везикулярных бислоев, подобных липосомам, состоящим из природных фосфолипидов.

Таким образом, DDA представляет собой синтетическое поверхностно-активное вещество, состоящее из гидрофильной катионной четвертичной аммониевой головной группы и двух гидрофобных насыщенных C18-алкильных цепей. Благодаря своим поверхностно-активным свойствам, молекулы DDA подвергаются самосборке в липосомоподобные структуры при диспергировании в водной среде.

Липосомная композиция согласно изобретению содержит катионный липид DDA в виде различных солей, наиболее предпочтительно, бромида или хлорида диметилдидециламмония (DDA-B или DDA-C) или его сульфатной, фосфатной или

ацетатной соли (DDA-X), или бромида или хлорида диметилдиоктадециламмония (DODA-B или DODA-C), или его сульфатного, фосфатного или ацетатного соединения (DODA-X). Наиболее предпочтительно, липосомная композиция согласно изобретению содержит бромид диметилдиоктадециламмония.

DDA имеет номер CAS: 3700-67-2.

Однако, липосомная композиция согласно изобретению может содержать дополнительные катионные липиды.

MMG

Микобактериальный липид мономиколоилглицерин (MMG) представляет собой гликолипид, который стабилизирует липосому, образованную катионным поверхностно-активным веществом DDA, посредством включения в мембрану липосомы.

Катионные липосомы стабилизируют путем включения гликолипидов, таких как MMG, и необязательно дополнительных гликолипидов в мембраны липосом.

Гликолипиды, такие как MMG, сами по себе обладают иммуностимулирующими свойствами и могут действовать синергически с соединениями четвертичного аммония (DDA) для усиления иммунного ответа.

Синтетический аналог, называемый MMG-1, состоит из гидрофильной глицериновой головной группы и липидной кислоты с двумя гидрофобными насыщенными C14/C15-алкильными хвостами, связанными сложноэфирной связью. Кроме того, существует множество аналогов MMG, отличающихся длиной алкильной цепи (MMG-2; C16/C17, MMG-3; C10/C11 и MMG-4; C6/C7) или стереохимией головной группы (MMG-5; 2S) и липидным хвостом (MMG-6).

MMG предпочтительно представляет собой синтетически полученный гликолипид MMG-1.

Химическая структура предпочтительного аналога MMG представляет собой 2,3-дигидроксипропиловый сложный эфир 3-гидрокси-2-тетрадецилоктадекановой кислоты, а предпочтительно, диастереомер (2R)-2,3-дигидроксипропил-3-гидрокси-2-тетрадецилоктадеканоата.

Poly(I:C)

Термин «Poly(I:C)» или «Poly-I:C» в соответствии с настоящим изобретением включает одноцепочечную полиинозиновую кислоту (Poly-I) и одноцепочечную полицитидиловую кислоту (Poly-C), которые не связаны водородными связями или ковалентной связью во время введения, а также двухцепочечные или комплексные Poly-I/Poly-C. При введении на влажную поверхность слизистой оболочки, некомплексные Poly-I и Poly-C могут образовывать комплексные Poly(I:C) и, таким образом, инициировать врожденный иммунный ответ и обеспечивать защиту от вирусной инфекции.

Предпочтительно, Poly(I:C) представляет собой синтетически полученный аналог двухцепочечной РНК, состоящий из цепей полиинозиновой кислоты, гибридизированных с цепями полицитидиловой кислоты или ее аналогов. Poly(A:U) (полиадениловая-полиуридиловая кислота) может быть использована в качестве альтернативного аналога.

Молекулярная масса Poly(I:C) зависит от длины полимера. Калиевая соль Poly-I:C имеет молекулярную массу 10-750 кДа с предпочтительным диапазоном 100-750 кДа. Poly-I:C имеет номер CAS: 24939-03-5.

Циклический динуклеотид

Термин «циклический динуклеотид» согласно изобретению означает группу соединений, включающую c-di-GMP, c-di-AMP, 3',3'-циклический GMP-AMP (3',3'cGAMP) и 2',3'-циклический GMP-AMP (2',3'cGAMP), которые действуют как мощные иммуностимулирующие молекулы или иммуномодуляторы. Было показано, что вторичный матричный c-di-GMP, структурированный как цикл, содержащий два гуаниновых основания, связанных рибозой и фосфатом, активирует «стимулятор генов интерферона» (STING), то есть, агонисты STING, что приводит к повышению уровня секреции IFN-I.

Дополнительные адъюванты

В контексте настоящего изобретения, термин «адъювант» относится к соединению или смеси, которые дополнительно усиливают иммунный ответ. Адъювант может служить тканевым депо, медленно высвобождающим антиген, и активатором лимфоидной системы, неспецифически усиливающим иммунный ответ, то есть, иммуномодулятором.

Под иммуномодулятором подразумевается любой компонент, который усиливает эффект или действует синергически для достижения иммунного ответа. Это усиление может осуществляться неспецифически или специфически под действием рецепторов распознавания паттерна (PRR), включая, но не ограничиваясь ими, лектиновые рецепторы С-типа (CLR), RIG-подобные рецепторы (RLR), белки домена олигомеризации, связывающиеся с нуклеотидами (NOD), и ловушко-подобные рецепторы (TLR).

Иммуногенность липосом может быть усилена включением иммуностимулирующих лигандов (также известных как иммуномодуляторы) для так называемых рецепторов распознавания паттерна (PRR), распознающих консервативные молекулярные структуры, известные как ассоциированные с патогеном молекулярные структуры (PAMP). Способность PAMP модулировать врожденный иммунный ответ и, таким образом, адаптивный ответ можно с успехом использовать для профилактики или лечения патогенной инфекции дыхательных путей.

Так называемые рецепторы распознавания паттерна (PRR) включают рецепторы лектина С-типа, RIG-подобные рецепторы, белки домена олигомеризации, связывающегося с нуклеотидом (NOD), и ловушко-подобные рецепторы (TLR), семейство которых постоянно пополняется. PAMP различаются среди патогенов и включают такие молекулы, как фактор цепи (TDM), флагеллин, липополисахарид (LPS), пептидогликаны и несколько вариантов нуклеиновых кислот, таких как двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (дцРНК). За эти годы было получено множество иммуномодуляторов, индуцируемых PAMPs. К ним относятся дибенгнат трегалозы (TDB), синтетический мономиколилглицерин (MMG), монофосфорил-липид А (MPL), полиинозиновая кислота:полицитидиловая кислота (poly(I:C)). Комбинация липосом с этими PAMP/иммуномодуляторами представляет собой привлекательный подход для разработки

способа профилактики или лечения патогенной инфекции на ранней стадии, где РАР/иммуномодуляторы стимулируют антигенпрезентирующие клетки, и тем самым усиливают иммунный ответ.

Другими адъювантами являются, но не ограничиваются ими, Quil A, QS21, гидроксид алюминия, неполный адъювант Фрейнда, монофосфориллипид А (MPL), димиколат трегалозы (TDM), мурамилдипептид (MDP), «IC31», сапонин, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы-пльороники, полианионы, пептиды, масляные или углеводородные эмульсии, гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол или их комбинации. Предпочтительно, адъювант является фармацевтически приемлемым.

Липосома

Термин «липосома» или «липосомная композиция» имеет широкое определение везикул, состоящих из липидных бислоев, окружающих водные компартменты. Мембранообразующие липиды являются амфифильными и соответственно содержат полярную и неполярную области. Полярная область обычно состоит из фосфатной группы, кислотной группы и/или солей третичного или четвертичного аммония и может иметь суммарный отрицательный (анионный), нейтральный или положительный (катионный) поверхностный заряд при физиологическом рН, в зависимости от состава головных групп липидов. рН предпочтительно доводят до физиологического рН, например, путем доведения дисперсии до рН 5,0-8,0 в трис- или гистидиновом буфере, а наиболее предпочтительно, рН доводят до 6,5-7,5. Неполярная область обычно состоит из одной или нескольких цепей жирных кислот по меньшей мере с 8 атомами углерода и/или холестерина. Липиды, составляющие мембраны везикулярного бислоя, организованы таким образом, что неполярные углеводородные «хвосты» ориентированы к центру бислоя, тогда как полярные «головы» ориентированы, соответственно, к внутренней и внешней водной фазе.

Таким образом, термины «липосома» или «липосомный» определяются как закрытые везикулярные структуры, состоящие из одного или нескольких липидных бислоев, окружающих водное ядро. Каждый липидный бислой состоит из двух липидных монослоев, каждый из которых имеет гидрофобную «хвостовую» область и гидрофильную полярную «головную» область. В липидном бислое, гидрофобные «хвосты» липидных монослоев ориентированы вовнутрь бислоя, тогда как гидрофильные «головы» ориентированы к внешней стороне бислоя. Липосомы могут иметь различные физико-химические свойства, такие как размер, состав липидов, поверхностный заряд, текучесть и количество бислойных мембран. В зависимости от количества липидных бислоев, липосомы можно разделить на однослойные везикулы (UV) или небольшие однослойные везикулы (SUV), содержащие один липидный бислой, или многослойные везикулы (MLV), содержащие два или более концентрических бислоев, каждый из которых отделен от другого слоя водой. Водорастворимые соединения захватываются водными фазами/ядром липосом, в отличие от липофильных соединений, которые захватываются ядром/центром липидных бислойных мембран.

Предполагается, что термин «катионный липид» или «катионная липосома» включает любой амфифильный липид, в том числе природные, а также синтетические липиды и аналоги липидов, которые имеют гидрофобные и полярные головные группы, суммарный положительный заряд при физиологически приемлемом pH, и способны образовывать в воде двухслойные везикулы или мицеллы.

Другие катионные липиды, используемые в качестве дополнительных адъювантов

Другими катионными липидными соединениями, которые могут быть включены в липосомную композицию согласно изобретению в качестве дополнительных адъювантов, являются 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP), 1,2-димиристоил-3-триметиламмонийпропан, 1,2-дипальмитоил-3-триметиламмонийпропан, 1,2-дистеароил-3-триметиламмонийпропан, диолеоил-3-диметиламмонийпропан (DODAP), N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний (DOTMA), октадеценилокси(этил-2-гептадеценил-3-гидроксиэтил)имидазолиний (DOTIM), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-этилфосфоколин (DOEPC) и 3-тетрадециламино-трет-бутил-N-тетрадецилпропион-амидин (ди-C14-амидин).

Цепь жирной кислоты представляет собой разветвленную или неразветвленную насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь алкильных или ацильных групп.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, которое не влияет на эффективность или биологическую активность активных ингредиентов и которое не является токсичным для хозяина или пациента.

Катионные липосомы стабилизируют путем включения гликолипидов, таких как MMG, и необязательно дополнительных гликолипидов в мембраны липосом. Под «включением» подразумеваются процедуры включения гидрофобной области и гидрофильной области молекулы в соответствующую гидрофобную и гидрофильную область или часть мембраны, мицеллы, липосомы или бислоя. Процедуры включения гликолипидов в липосомы могут представлять собой «метод тонких пленок», «метод обращенно-фазового выпаривания», «метод введения органического раствора», «метод двойного эмульгирования», «метод смешивания с высоким сдвиговым усилием», «метод микрофлюидизации» и другие неизвестные в настоящее время методы, которые будут давать такой же эффект включения гликолипидов в мембраны липосом. Известные в настоящее время способы упомянуты в главе «Предпосылки создания изобретения».

Гликолипид определяют как любое соединение, содержащее один или несколько остатков моносахаридов или глицерина, связанных гликозидной связью с гидрофобным фрагментом, таким как жирная кислота с длинной цепью, ацилглицерин, сфингоид, церамид или пренилфосфат. Другие гликолипиды согласно изобретению могут иметь синтетическое, растительное или микробное происхождение, например, они могут происходить от микобактерий.

Один класс гликолипидов, который может быть использован в настоящем изобретении в дополнение к MMG в качестве вспомогательного адъюванта, представляет

собой ацилированные (или алкилированные) гликозиды, которые состоят из одного или двух остатков сахаров, этерифицированных одной, двумя или даже тремя жирными кислотами. Жирные кислоты могут иметь либо прямую цепь, включая насыщенные жирные кислоты, например, миристиновую кислоту C14:0, пентадекановую кислоту C:15, пальмитиновую кислоту C16:0, гептадекановую кислоту C17:0, стеариновую кислоту C18:0, нонадекановую кислоту C:19, арахидоновую кислоту, C:20, генейкозановую кислоту C21:0, бегеновую кислоту C:22 и ненасыщенные жирные кислоты, например, олеиновую кислоту C18:1n-9, линолевую кислоту 18:2n-6, или комплексные разветвленные жирные кислоты, такие как миколиновая кислота, метоксимиколиновые кислоты, кетомиколиновые кислоты, эпоксимиколиновые кислоты и кориномиколиновая кислота. Остатки сахара могут представлять собой либо простые моносахариды, например, глюкозу и фруктозу, либо дисахариды, содержащие два ковалентно связанных моносахарида, например, сахарозу, состоящую из глюкозы и фруктозы, и трегалозу, в которой два глюкозных звена соединены гликозидной связью. Одним типом гликолипидов, используемых в настоящем изобретении, являются гликолипиды клеточной стенки, выделенные из микобактерий, которые состоят из дисахарида, этерифицированного одной, двумя или тремя обычными пальмитиновыми кислотами, C16:0; олеиновой кислотой, C18:1n-9; линолевой кислотой, 18:2n-6, или сложными жирными оксикислотами с разветвленной цепью, то есть, остатками миколиновой кислоты длиной от 60 до 90 атомов углерода. Другие бактериальные гликолипиды, используемые в настоящем изобретении, имеют более короткие цепи жирных кислот, например, они представляют собой кориномиколиновую (22-36 атомов углерода) или нокардомиколиновую (44-60 атомов углерода) кислоту, выделенную из *Corynebacterium*, *Nocardia*. Предпочтительным гликолипидом микобактерий является альфа,альфа'-трегалозо-6,6'-димиколят (TDM), часто называемый фактором цепи, который является одним из наиболее важных иммуномодулирующих компонентов клеточной стенки микобактерий. В конкретном предпочтительном варианте осуществления изобретения, гликолипид состоит из дисахарида альфа,альфа'-трегалозы, этерифицированного двумя докозановыми жирными кислотами (бегеновой кислотой), например, альфа,альфа'-трегалозо-6,6'-дибегенатом (TDB), который является чистым синтетическим аналогом TDM. Само собой разумеется, что другой предпочтительный микобактериальный гликолипид представляет собой мономиколилглицерин или предпочтительно синтетический аналог 2,3-дигидроксипропилового эфира 3-гидрокси-2-тетрадецилоктадекановой кислоты или близкородственные соединения с более короткими или более длинными ацильными цепями.

Другие классы гликолипидов, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими:

Гликолипиды на основе глицерина: эти липиды состоят из моно- или олигосахаридного фрагмента, гликозидно связанного с гидроксильной группой глицерина, который может быть ацилирован (или алкилирован) одной или двумя жирными кислотами. Кроме того, эти гликолипиды могут быть незаряженными, а поэтому часто называются

нейтральными гликоглицеролипидами или могут содержать сульфатную или фосфатную группу. Предпочтительным гликолипидом этого класса согласно изобретению является мономиколилглицерин (MMG) (Andersen et al 2009a, Andersen et al 2009b) или его синтетические аналоги, такие как 2,3-дигидроксипропиловый эфир 3-гидрокси-2-тетрадецилоктадекановой кислоты или близкородственные соединения с более короткой или более длинной ацильной цепью (Andersen et al 2009b, Nordly et al. 2011);

Другие гликолипиды на основе церамидов: Гликофинголипиды в соответствии со структурой углеводной части делятся на нейтральные гликофинголипиды, содержащие незамещенную гликозильную группу, и кислотные гликофинголипиды, содержащие гликозильную группу с кислотной карбоксильной, сульфатной или фосфатной группой.

Липополисахариды (LPS) могут быть использованы в качестве дополнительного адъюванта. Эти сложные соединения представляют собой эндотоксические антигены, обнаруженные в клеточных стенках грамотрицательных бактерий (S-липополисахариды). Липидная часть (липид А) образует комплекс с полисахаридом посредством гликозидной связи. Липид А состоит из основной цепи b-1,6-глюкозаминил-глюкозамина с двумя фосфоэфирными группами в 1-м положении глюкозамина I и в 4-м положении глюкозамина II. Положение 3 глюкозамина II образует кислото-неустойчивую гликозидную связь с длинноцепочечным полисахаридом. Другие группы замещены (в *Escherichia*) гидроксильрованными жирными кислотами, такими как гидроксимиристат (две со сложноэфирной связью и две с амидной связью), и нормальными жирными кислотами (лауратом). Особенно предпочтительным липополисахаридом согласно изобретению являются монофосфорильные производные липида А (MPL), которые являются нетоксичными и обладают превосходными адъювантными свойствами.

Гликозиды стеролов могут быть использованы в качестве дополнительного адъюванта. Это семейство состоит из одного углеводного звена, связанного с гидроксильной группой одной молекулы стерола. Было определено, что стерольная часть состоит из различных стеролов: холестерина, кампестерола, стигмастерола, ситостерола, брассикастерола и дигидроситостерола. Сахарная часть состоит из глюкозы, ксилозы и даже арабинозы.

Гликозиды жирных кислот или спиртов могут быть использованы в качестве дополнительных адъювантов. Большое количество простых гликолипидов содержится в бактериях, дрожжах и низших организмах (губках). Эти соединения состоят из гликозильного фрагмента (одного или нескольких звеньев), связанного с одной гидроксильной группой жирного спирта или гидроксильной группы жирной кислоты, или с одной карбоксильной группой жирной кислоты (сложноэфирная связь). Эти соединения часто обладают интересными физическими или биологическими свойствами. Некоторые из них получают промышленным способом из-за их моющих свойств (алкилгликозиды).

Кроме того, макромолекулы, например, олигонуклеотиды, пептидные или белковые антигены, могут быть захвачены водной фазой как однослойных, так и многослойных липосом композиции согласно изобретению.

Реакция образования комплекса веществ включает, но не ограничивается ими, нековалентное связывание, например, электростатическое взаимодействие, гидрофобное притяжение макромолекул к липосомам с одинаковым или противоположным зарядом.

Макромолекулы могут быть использованы в качестве дополнительного адъюванта. Макромолекулу определяют как очень крупную молекулу, такую как белок, состоящий из множества более мелких структурных звеньев, связанных вместе; а молекулы, такие как ДНК и РНК, которые являются очень крупными и сложными, определяют как макромолекулы. Этот термин применим к четырем традиционным биополимерам (к нуклеиновым кислотам, белкам, углеводам и липидам), а также к неполимерным молекулам с большой молекулярной массой. Макромолекулами, используемыми в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды, пептиды, белки, углеводы и липиды.

В настоящем изобретении раскрывается гомогенное смешивание липосомных липидных компонентов, таких как катионные поверхностно-активные вещества, такие как DDA, и гликолипиды, такие как MMG, перед гидратацией и после гидратации с последующим возможным проведением реакции образования комплекса с другими макромолекулами. Смешивание липидных компонентов с другими макромолекулами (например, с олигонуклеотидами) может быть также осуществлено перед гидратацией, и смешивание с высоким сдвиговым усилием приводит к образованию комплекса. Комплексы между катионными липидами, а в частности, отрицательно заряженными макромолекулами (например, олигонуклеотидами), обычно являются термодинамически нестабильными, что приводит к образованию с течением времени более крупных агрегатов, широкому распределению по размерам и к структурной гетерогенности. Связывание сильно заряженных полиэлектролитов с противоположно заряженными липосомами само по себе способствует дестабилизации мембран. Нейтрализация заряда и сопутствующее уменьшение площади внешней поверхности приводит к градиенту бокового давления в направлении нормали к бислою. Это создает изгибающий момент, который, в свою очередь, способствует дестабилизации липосом.

Следует отметить, что варианты осуществления и признаки, описанные в контексте одного из аспектов настоящего изобретения, также применимы и к другим аспектам изобретения.

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA) и по меньшей мере один иммуномодулятор для введения индивидууму в качестве лекарственного средства.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей катионный липид диметилдиоктадециламмония (DDA) и по меньшей мере один иммуномодулятор для введения индивидууму в целях профилактики или лечения патогенной инфекции дыхательных путей.

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к липосомной

композиции для ее применения в целях профилактики патогенной инфекции, где патогенная инфекция выбрана из вирусной или бактериальной инфекции.

Патогенная инфекция может представлять собой инфекцию дыхательных путей, таких как верхние или нижние дыхательные пути.

Таким образом, в дополнительном варианте осуществления изобретения, патогенная инфекция может представлять собой вирусную инфекцию дыхательных путей, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из пикорнавируса, риновируса, коронавируса, такого как MERS-коронавирус, SARS-коронавирус, такой как SARS-CoV-2; вируса гриппа, вируса парагриппа человека, респираторно-синцитиального вируса человека, аденовируса, энтеровируса и метапневмовируса.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, патогенная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию дыхательных путей, вызванную бактерией, выбранной из группы, состоящей из *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* и микобактерий, таких как *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. Canetti*, *M. Microti* и *Burkholderia Sp.*

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к липосомной композиции для ее применения, как раскрыто в настоящей заявке, где указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один гликолипид, такой как аналог мономиколоилглицерина (MMG).

Иммуномодулятор может быть выбран из иммуномодуляторов, которые могут передавать сигнал об ингибировании репликации вируса, или иммуномодуляторов, которые могут передавать сигнал об активации или рекрутинге провоспалительных клеток, уничтожающих патогены, таких как гранулоциты, макрофаги и NK-клетки.

Иммуномодулятор может быть выбран из группы, состоящей из агонистов STING, таких как циклический GMP-AMP (сGAMP), сAMP, с-di-AMP, сGMP и с-di-GMP; агонистов TLR2, таких как зимозан; агонистов TLR3, таких как двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (дцРНК), такие как полиинозиновая кислота:полицитидиловая кислота (poly(I:C)); агонистов TLR4, таких как MPL-A; агонистов TLR5, таких как флагеллин; агонистов TLR7/8, таких как резихимод, имихимод, гардихимод, включая также липидизированные аналоги; рецепторов лектина С-типа, таких как фактор цепи (TDM) или синтетический аналог TDB; агонистов рецепторов домена олигомеризации, связывающегося с нуклеотидом (NOD), таких как MDP. Предпочтительно, иммуномодулятор представляет собой полиинозиновую кислоту:полицитидиловую кислоту (poly(I:C)), а более предпочтительно синтетический аналог двухцепочечной poly(I:C)-РНК.

В одном варианте настоящего изобретения, иммуномодулятор предпочтительно представляет собой агонист STING, выбранный из группы, состоящей из сGAMP, сAMP, сGMP, с-di-AMP и с-di-GMP, а более предпочтительно, с-di-GMP.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, аналог мономиколоилглицерина (MMG) липосомной композиции предпочтительно представляет

собой аналог 2,3-дигидроксипропилового эфира 3-гидрокси-2-тетрадецилоктадекановой кислоты.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, DDA липосомной композиции предпочтительно представляет собой бромид диметилдиоктадециламмония.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к раскрытой здесь липосомной композиции, содержащей катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA) и мономиколоилглицерин (MMG). Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к описанной здесь липосомной композиции, содержащей 1-3 мг/мл DDA и 0,1-1,0 мг/мл MMG-1. Липосомная композиция предпочтительно содержит 2,5 мг/мл DDA и 0,5 мг/мл MMG-1.

В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей 0,1-1,0 мг/мл poly(I:C), предпочтительно 0,5 мг/мл poly(I:C) (что соответствует содержанию CAF®09), а особенно предпочтительно, 0,125 мг/мл poly(I:C) (что соответствует содержанию CAF®09b).

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь липосомной композиции, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA), мономиколоилглицерин (MMG) и по меньшей мере еще один иммуномодулятор.

В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь липосомной композиции, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA), мономиколоилглицерин (MMG), poly(I:C) и по меньшей мере еще один иммуномодулятор.

В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к липосомной композиции, описанной в настоящей заявке, где липосомная композиция содержит иммуномодулирующий c-di-GMP.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь липосомной композиции, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA), мономиколоилглицерин (MMG) и c-di-GMP.

В еще одном своем варианте, настоящее изобретение относится к описанной здесь липосомной композиции, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдиоктадециламмоний (DDA), мономиколоилглицерин (MMG), poly(I:C) и c-di-GMP.

В другом варианте осуществления изобретения, липосомная композиция дополнительно содержит агонист STING, предпочтительно c-di-GMP, в концентрации 0,025-2,5 г/мл, например, в концентрации 0,05-2,0 мг/мл, например, в концентрации 0,05-1,5 мг/мл, например, в концентрации 0,05-1,0 мг/мл, например, в концентрации 0,025-0,5 мг/мл, предпочтительно в концентрации 0,05-0,2 мг/мл, например, 0,1-0,2 мг/мл.

В другом варианте осуществления изобретения, липосомная композиция содержит 2,5 мг/мл DDA, 0,5 мг/мл MMG-1 и 0,1 мг/мл c-di-GMP.

В другом варианте осуществления изобретения, описанную здесь липосомную

композицию вводят путем системного, назального и/или внутрилегочного введения. Липосомная композиция может быть также введена как системно, так и интраназально.

В другом варианте осуществления изобретения, липосомная композиция может быть введена путем интраназального и/или внутрилегочного введения после контакта с патогеном для лечения инфекции дыхательных путей на ранней стадии.

В еще одном варианте осуществления изобретения, липосомную композицию вводят интраназально или внутрилегочно для профилактики инфекции дыхательных путей. Липосомная композиция может быть также введена как через нос, так и через легкие. В другом варианте осуществления изобретения, липосомную композицию вводят от одного до семи раз в неделю, например, два, три, четыре, пять или шесть раз в неделю.

Соответственно, индивидуум, у которого может наблюдаться положительный эффект от лечения согласно изобретению, может иметь хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), астму, кистозный фиброз или другое состояние, которое приводит к нарушению дыхательной функции по сравнению со здоровым индивидуумом. Индивидуумы с раком легкого также могут получать липосомную композицию согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такими пациентами также могут быть курильщики в прошлом или курильщики, которые в настоящее время курят сигареты или употребляют другие табачные изделия. Эти индивидуумы являются восприимчивыми к инфекциям верхних дыхательных путей, а поэтому введение раскрытой здесь композиции может предотвратить появление симптомов простуды или простудных заболеваний и, таким образом, предотвратить обострение основных заболеваний и симптомов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, индивидуум выбран из группы, состоящей из людей всех возрастов, других приматов (например, собакоподобных обезьян, макак-резусов); млекопитающих в целом, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, козы; кошек и/или собак; и/или птиц. Предпочтительным индивидуумом является человек.

В другом варианте осуществления изобретения, индивидуумами являются индивидуумы с нарушенным/сниженным иммунитетом дыхательных путей.

В другом варианте осуществления изобретения, индивидуум страдает заболеванием, выбранным из хронической обструктивной болезни легких, астмы, кистозного фиброза, рака легких и диабета. Кроме того, индивидуум может быть курильщиком в прошлом или может быть курильщиком в настоящее время.

В другом варианте осуществления изобретения, индивидуумом является здоровый индивидуум или здоровый индивидуум, подвергавшийся воздействию патогенов и нуждающийся в защите от инфекции, такой, как медицинский персонал.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к устройству для интраназального или внутрилегочного введения, содержащему липосомную композицию.

Особенно предпочтительными липосомными композициями согласно изобретению являются CAF®04, CAF®09 и CAF®09b.

CAF®04 представляет собой двухкомпонентную катионную липосомную адъювантную систему, разработанную специалистами Института Statens Serum Institut (Дания), и состоящую из катионных липосом DDA с гликолипидом и иммуномодулятором, мономиколоилглицерином (MMG), включенными в бислой липосомной мембраны.

CAF®09 и CAF®09b представляют собой трехкомпонентную катионную липосомную адъювантную систему, разработанную специалистами Института Statens Serum Institut (Дания), и состоящую из катионных липосом DDA с гликолипидом и иммуномодулятором, мономиколоилглицерином (MMG), включенными в бислой липосомной мембраны, и иммуномодулятора, poly(I:C), связанного с поверхностью липосомы.

Состав CAF®04, CAF®09 и CAF®09b:

CAF®04: 2500/500 мкг/мл DDA:MMG-1, диспергированного в 10 mM Трис+4% глицерина, доведенного до pH 7,0.

CAF®09: 2500/500/500 мкг/мл DDA:MMG-1:poly(I:C), диспергированного в 10 mM Трис+4% глицерина, доведенного до pH 7,0.

CAF®09b: 2500/500/125 мкг/мл DDA:MMG-1:poly(I:C), диспергированного в 10 mM трис+4% глицерина, доведенного до pH 7,0.

Все патентные и непатентные документы, цитируемые в настоящей заявке, в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Настоящее изобретение будет описано более подробно в нижеследующих неограничивающих примерах.

ПРИМЕРЫ

Эти примеры приводятся для иллюстрации настоящего изобретения.

В приведенных ниже примерах, CAF®04 и CAF®09b используются в качестве примера липосомной композиции согласно изобретению.

CAF®04 представляет собой двухкомпонентную катионную липосомную адъювантную систему, разработанную специалистами Института Statens Serum Institut (Дания), и состоящую из катионных липосом DDA с гликолипидом и иммуномодулятором, мономиколоилглицерином (MMG), включенными в бислой липосомной мембраны.

В состав CAF®04 2500/500 входят 2500 мкг DDA на мл и 500 мкг MMG на мл, диспергированных в 10 mM Триса+4% глицерина, доведенного до pH 7,0.

CAF®09b представляет собой трехкомпонентную катионную липосомную адъювантную систему, разработанную специалистами Института Statens Serum Institut (Дания), и состоящую из катионных липосом DDA с гликолипидом и иммуномодулятором, мономиколоилглицерином (MMG), включенными в бислой липосомной мембраны, и иммуномодулятора, poly(I:C), связанного с поверхностью липосомы.

В состав CAF®09b 2500/500/125 входят 2500 мкг DDA на мл, 500 мкг MMG на мл и 125 мкг poly(I:C) на мл, диспергированных в 10 mM Трис+4% глицерина, доведенного до pH 7,0.

Пример 1. Приток врожденных иммунных клеток

Мышам СВ6F1 интраназально вводили CAF®09b дважды с интервалом 72 часа. Через 24 часа, исследование было прекращено, и были выделены перфузированные легкие, а затем был проведен анализ методом проточной цитометрии для определения притока врожденных иммунных клеток (фиг. 2A). Интраназальное введение CAF®09b способствовало увеличению притока моноцитов (MHC II+, CD11b+, Ly6C+), Мф (MHC II+, F4/80+), ДК (MHC II+, CD11c+), нейтрофилов (Ly6G+) и NK-клеток (NK1.1+) в легкие. Электрохемилюминесцентный (MSD) анализ проводили для оценки уровня IFN-I в супернатанте клеток легких. После обработки CAF®09b, уровни IFN-α (фигура 2B) и IFN-β (фигура 2C) были повышены.

Пример 2. Провоспалительные маркеры и маркеры интерферона типа 1.

Мышей СВ6F1 дважды обрабатывали CAF®09b с интервалом в 72 часа или четыре раза с интервалом в 24 часа. Через 24 часа, исследование было прекращено, и были выделены перфузированные легкие, после чего был проведен кол.ПЦР-анализ с использованием массива для проведения ПЦР Qiagen RT2 Profiler в целях выявления провоспалительных маркеров и маркеров интерферона типа 1 для определения генов, уровень которых повышался после лечения. Полученные данные показали активацию генов, ассоциированных как с интерфероном типа 1, так и с провоспалительными реакциями, включая **маркеры поверхностной активации**: CD69, CD86, Tap1, H2-BI, H2-DI и H2-KI; **секретируемые маркеры передачи сигнала**: CCL2, CCL4, CCL5, Timp1 и CXCL10; **рецепторы распознавания паттерна, родственного IFN-I**: Adar, RIG-I, MDA-5, TLR3, TLR7 и TLR9; **гены, регулируемые IFN-I**: stat1, stat2, irf9, isg15, socs1, eif2ak2 и isg20; **маркеры ингибирования трансляции и репликации вируса**: ifit1, ifit2, ifit3, mx1 и mx2; **маркеры продуцирования IFN-I**: irf7, ifi204 и pm1 (фигура 3+4A-F). Эти данные показали, что CAF®09b индуцирует врожденный иммунный ответ, необходимый для защиты от вирусов.

Пример 3 - Масса и выживаемость после заражения гриппом

Мышей СВ6F1 дважды интраназально обрабатывали CAF®09b с интервалом в 3 дня. Мышей заражали гриппом через 4 и 10 дней после **первой** иммунизации. Мониторинг массы (фигура 5A) и выживаемость (фигура 5B) осуществляли в течение 7 дней. 4/6 мышей в группе, не подвергавшейся обработке, и только 1/6 мышей в группе, получавшей CAF®09b за одну неделю до заражения, достигали конечной массы, определяемой для человека, и их отбрасывали. Ни одна из мышей, получавших CAF®09b за день до заражения, не достигла конечной точки, определяемой для человека во время исследования. Данные этого исследования позволяют предположить, что эффективность лечения сохраняется по меньшей мере в течение недели.

Пример 4 - НА-специфические антитела

Кровь брали у мышей как описано в примере 3 в день, когда их умерщвляли, чтобы выяснить, приводит ли врожденная защита к снижению адаптивного иммунитета. Антитела, специфичные к НА вируса гриппа, оценивали с помощью ELISA (фигура 6).

Полученные данные показали, что лечение препаратом CAF®09b, несмотря на

ослабление симптомов, не влияет на вызванное инфекцией индуцирование приобретенного иммунитета, поскольку уровни антител после заражения в группах, получавших CAF®09b, были на уровне антител для группы, не подвергавшейся обработке, если не выше.

Пример 5 - CAF®04 в комбинации с агонистом STING

Подтверждение эффективности CAF®04 (2500/500 мкг/мл DDA/MMG-1) проводили в сочетании с агонистом STING (стимулятором генов интерферона) c-di-GMP в концентрации 100 мкг/мл, который может регулировать транскрипцию генов защиты хозяина, включая провоспалительные цитокины и хемокины, а также интерфероны типа 1 (IFN). Мышей обрабатывали **четыре раза** с 24-часовым интервалом либо только c-di-GMP, либо только CAF®04, либо CAF®04+c-di-GMP, и заражали вирусом гриппа через 5 дней после первой иммунизации. Выживаемость (Фигура 7A), вирусную нагрузку (Фигура 7B) и массу (Фигура 7C-F) отслеживали в течение 14 дней. Все мыши в группе, не подвергавшейся обработке (фигуры 7A, C), 6/8 мышей в группе c-di-GMP (фигура 7A, D) и 4/8 мышей в группе CAF®04 (фигура 7A, E), но только 3/8 мышей в группе CAF®04+c-di-GMP достигали конечной массы, определяемой для человека, и их пришлось отбросить. Данные этого исследования позволяют предположить, что CAF®04 и c-di-GMP дают синергическую эффективность лечения, что приводит к превосходной эффективности комбинации. Это также отражается на способности снижать вирусную нагрузку (фигура 7B).

Пример 6 - CAF®09b в комбинации с агонистом STING

Подтверждение эффективности CAF®09b (2500/500/125 мкг/мл DDA/MMG-1/polyIC) проводили в сочетании с агонистом STING (стимулятором генов интерферона) c-di-GMP в концентрации 100 мкг/мл, которые могут регулировать транскрипцию генов защиты хозяина, включая провоспалительные цитокины и хемокины, а также интерфероны типа I (IFN). Мышей обрабатывали **два раза** с 3-дневным интервалом либо только c-di-GMP, либо только CAF®09b, либо CAF®09b+c-di-GMP, и через 5 дней после первой иммунизации заражали высокой дозой вируса гриппа. Выживаемость (Фигура 8A), вирусную нагрузку (Фигура 8B) и массу (Фигура 8C-F) отслеживали в течение 14 дней. Все мыши в группе, не подвергавшейся обработке (фигуры 8A, C), 7/8 мышей в группе c-di-GMP (фигура 8A, D) и 6/8 мышей в группе CAF®09b (фигура 8A, E), но только 5/8 мышей в группе CAF®09b+c-di-GMP достигали конечной массы, определяемой для человека, и их пришлось отбросить. Данные этого исследования позволяют предположить, что CAF®09b и c-di-GMP дают синергическую эффективность лечения, что приводит к превосходной эффективности комбинации. Это также отражается на способности снижать вирусную нагрузку (фигура 8B).

Пример 7 - Комбинация CAF®04, CAF®09 и агониста STING

Подтверждение эффективности CAF®04 (2500/500 мкг/мл DDA/MMG-1) и CAF®09b (2500/500/125 мкг/мл DDA/MMG-1/polyIC) проводили в комбинации с агонистом STING c-di-GMP в концентрации 100 мкг/мл, для оценки способности блокировать репликацию вируса в носу. Мышам **два раза** с 3-дневным интервалом вводили c-di-GMP,

CAF®04, CAF®09b, CAF®04+c-di-GMP, CAF®09b+c-di-GMP и вводили высокую дозу вируса гриппа через 5 дней после **первой** иммунизации. Вирусную нагрузку, оцененную по относительной экспрессии мРНК вируса гриппа (фигура 9А) и по значениям СТ (фигура 9В; значение СТ равно общему количеству циклов, необходимых для обнаружения РНК, и каждый положительный тест имеет собственное значение СТ; если РНК не была обнаружена в течение 37-40 циклов, то тест считается отрицательным), анализировали в носу через два дня после заражения. Данные этого исследования позволяют предположить, что c-di-GMP способствует снижению репликации вируса в носу, чему еще больше способствует комбинация с CAF®04 и CAF®09b, и что эта комбинация таким образом дает синергическую эффективность лечения, предотвращая тем самым пролиферацию вируса в носу. Это коррелирует со способностью адъювантов, содержащих c-di-GMP, к рекрутингу повышенных уровней активированных НК-клеток (фигура 9С), воспалительных моноцитов (фигура 9D) и нейтрофилов (фигура 9Е) перед инфекцией. И только CAF®09b+c-di-GMP значительно увеличивал уровни макрофагов (фигура 9F) и дендритных клеток (фигура 9G).

Пример 10 - CAF®09b и SARS-CoV-2

Сирийских золотистых хомячков дважды интраназально обрабатывали CAF®09b с интервалом в 3 дня. Хомячков инфицировали SARS-CoV-2 ($1,9 \times 10^5$ TCID₅₀) через 5 дней после первой иммунизации. Массу контролировали в течение 7 дней как показатель состояния здоровья. У хомячков, не обработанных CAF®09b, наблюдалась значительно большая потеря массы, чем в группе, получавшей CAF®09b, и их масса не восстанавливалась на 7-й день, в отличие от группы, получавшей CAF®09b (Фигура 10).

Библиография

1. Hackett, C. J. Innate immune activation as a broadspectrum biodefense strategy: Prospects and research challenges. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* **112**, 8 (2003).
2. Hogan, R. J. *et al.* Resolution of primary severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection requires Stat1. *J Virol* **78**, 11416-11421, doi:10.1128/JVI.78.20.11416-11421.2004 (2004).
3. Taylor, D. R. Obstacles and advances in SARS vaccine development. *Vaccine* **24**, 863-871, doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.102 (2006).
4. Uematsu, S. & Akira, S. Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* **282**, 15319-15323, doi:10.1074/jbc.R700009200 (2007).
5. Lau, Y. F., Tang, L. H., McCall, A. W., Ooi, E. E. & Subbarao, K. An adjuvant for the induction of potent, protective humoral responses to an H5N1 influenza virus vaccine with antigen-sparing effect in mice. *J Virol* **84**, 8639-8649, doi:10.1128/JVI.00596-10 (2010).
6. Lau, Y. F., Tang, L. H., Ooi, E. E. & Subbarao, K. Activation of the innate immune system provides broad-spectrum protection against influenza A viruses with pandemic potential in mice. *Virology* **406**, 80-87, doi:10.1016/j.virol.2010.07.008 (2010).
7. Martins, K. A., Bavari, S. & Salazar, A. M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Rev Vaccines* **14**, 447-459, doi:10.1586/14760584.2015.966085 (2015).

8. Pedersen, G. K., Andersen, P. & Christensen, D. Immunocorrelates of CAF family adjuvants. *Semin Immunol* **39**, 4-13, doi:10.1016/j.smim.2018.10.003 (2018).
9. Abraham, S. *et al.* Safety and immunogenicity of the chlamydia vaccine candidate CTH522 adjuvanted with CAF01 liposomes or aluminium hydroxide: a first-in-human, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* **19**, 1091-1100, doi:10.1016/S1473-3099(19)30279-8 (2019).
10. Vrieze, J. d. Can a century-old TB vaccine steel the immune system against the new coronavirus? *Science* (2020).
11. Virology. 2009 Dec 20; 395(2): 210-222.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липосомная композиция, содержащая катионный липид диметилдидециламмоний (DDA) и по меньшей мере один иммуномодулятор, для ее применения в качестве лекарственного средства у индивидуума.

2. Липосомная композиция, содержащая катионный липид диметилдидециламмоний (DDA) и по меньшей мере один иммуномодулятор для применения в целях профилактики или лечения патогенной инфекции дыхательных путей у индивидуума.

3. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдидециламмоний (DDA) и мономицелин (MMG).

4. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит или состоит из 1-3 мг/мл DDA и 0,1-1,0 мг/мл MMG.

5. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит 2,5 мг/мл DDA и 0,5 мг/мл MMG.

6. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдидециламмоний (DDA), мономицелин (MMG) и по меньшей мере еще один иммуномодулятор.

7. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где иммуномодулятор представляет собой полиинозиновую кислоту:полицитидиловую кислоту (poly(I:C)), предпочтительно синтетический аналог двухцепочечной poly(I:C) РНК.

8. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая или состоящая из 0,05-1,0 мг/мл poly(I:C), предпочтительно 0,1-0,5 мг/мл poly(I:C), например 0,5 мг/мл poly(I:C).

9. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, содержащая 0,125 мг/мл poly(I:C).

10. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдидециламмоний (DDA), мономицелин (MMG), poly(I:C) и по меньшей мере еще один иммуномодулятор.

11. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из агонистов STING, таких как cGAMP, cAMP, c-di-AMP, cGMP и c-di-GMP; агонистов TLR2, таких как зимозан; агонистов TLR3, таких как двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (дцРНК), такие как полиинозиновая кислота:полицитидиловая кислота (poly(I:C)); агонистов TLR4, таких как MPL-A; агонистов TLR5, таких как флагеллин; агонистов TLR7/8, таких как резихимод, имихимод, гардихимод, включая также липидизированные аналоги; рецепторов лектина C-

типа, таких как фактор цепи (TDM) или синтетический аналог TDB; агонистов рецепторов домена олигомеризации, связывающегося с нуклеотидом (NOD), таких как MDP.

12. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит иммуномодулирующий c-di-GMP, предпочтительно в концентрации 0,05-0,2 мг/мл, а особенно предпочтительно 0,1 мг/мл.

13. Липосомная композиция для применения по п. 12, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдиооктадециламмоний (DDA), мономиколоилглицерин (MMG) и c-di-GMP.

14. Липосомная композиция для применения по п. 12, где липосомная композиция содержит катионный липид диметилдиооктадециламмоний (DDA), мономиколоилглицерин (MMG), poly(I:C) и c-di-GMP.

15. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где патогенная инфекция выбрана из вирусной инфекции и бактериальной инфекции.

16. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где патогенная инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей, таких как верхние или нижние дыхательные пути.

17. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где патогенная инфекция представляет собой вирусную инфекцию дыхательных путей, вызванную вирусом, выбранным из группы, состоящей из пикорнавируса; риновируса; коронавируса, такого как MERS-коронавирус, SARS-коронавирус, такой как SARS-CoV-2; вируса гриппа; вируса парагриппа человека; респираторно-синцитиального вируса человека; аденовируса; энтеровируса и метапневмовируса.

18. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где патогенная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию дыхательных путей, вызванную бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Chlamydia pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* и микобактерий, таких как *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* и *M. microti*. и *Burkholderia Sp.*

19. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где иммуномодулятор выбран из иммуномодуляторов, которые могут передавать сигнал об ингибировании репликации вируса, или иммуномодуляторов, которые могут передавать сигнал об активации или рекрутинге провоспалительных клеток, уничтожающих патогены, таких как гранулоциты, макрофаги и NK-клетки.

20. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где аналог мономиколоилглицерина (MMG) представляет собой аналог 2,3-дигидроксипропилового эфира 3-гидрокси-2-тетрадецилоктадекановой кислоты.

21. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где DDA представляет собой бромид диметилдиооктадециламмония.

22. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих

пунктов, не содержащая антиген.

23. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомная композиция содержит по меньшей мере один дополнительный адъювант или иммуномодулятор.

24. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомную композицию вводят путем системного введения, интраназального введения и/или введения в легкие.

25. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомную композицию вводят как системно, так и интраназально.

26. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомную композицию вводят путем интраназального и/или внутрилегочного введения после контакта с патогеном для лечения инфекции дыхательных путей на ранней стадии.

27. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомную композицию вводят путем интраназального и/или внутрилегочного введения для профилактики инфекции дыхательных путей.

28. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где липосомную композицию вводят два или три раза в неделю.

29. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где индивидуум выбран из группы, состоящей из людей всех возрастов, других приматов (например, собакоподобных обезьян, макак-резусов); млекопитающих в целом, включая сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, козы; кошек и собак, а также птиц.

30. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где индивидуумом является человек.

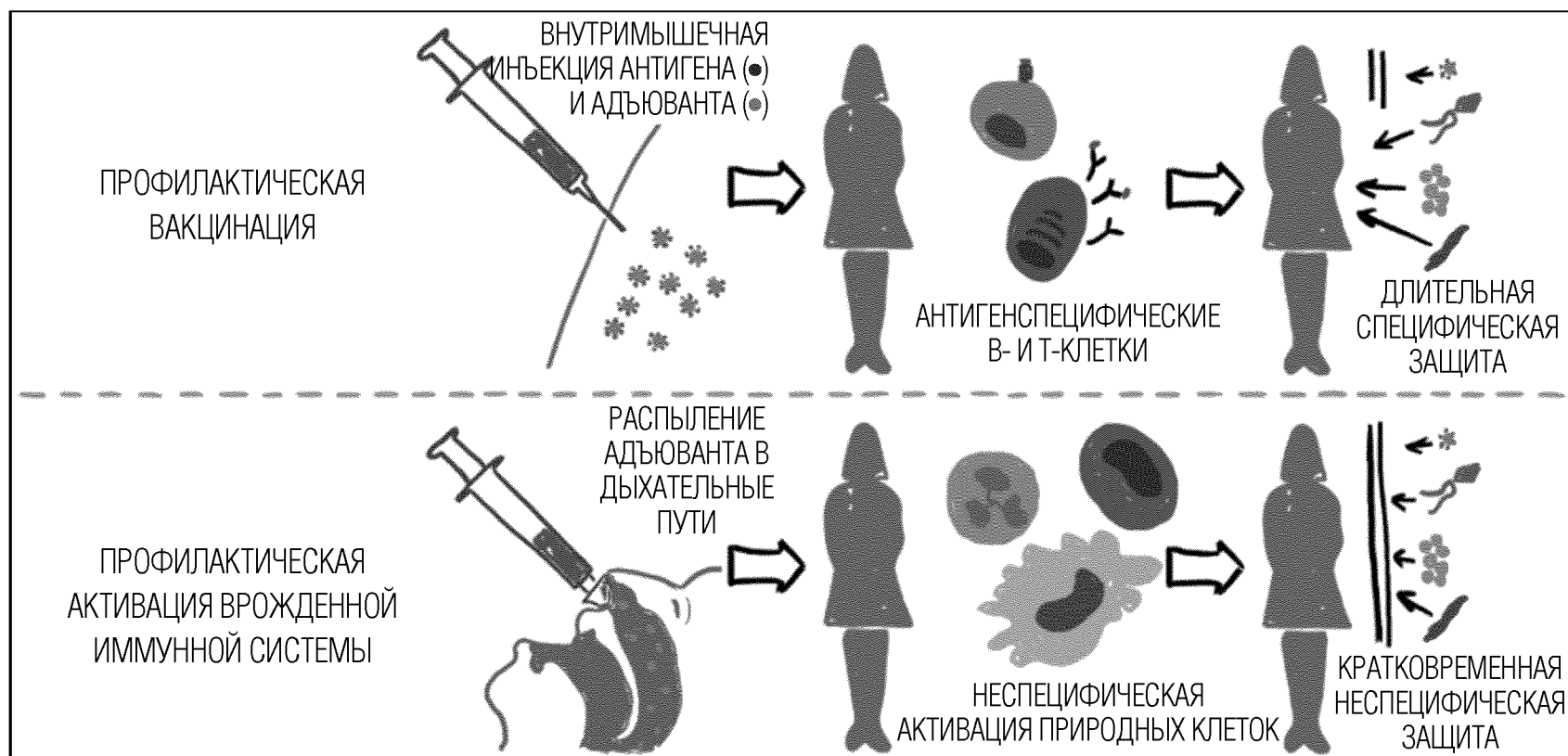
31. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где индивидуумом является индивидуум с ослабленным/сниженным иммунитетом дыхательных путей.

32. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где индивидуум страдает заболеванием, выбранным из хронической обструктивной болезни легких, астмы, кистозного фиброза, рака легких и диабета.

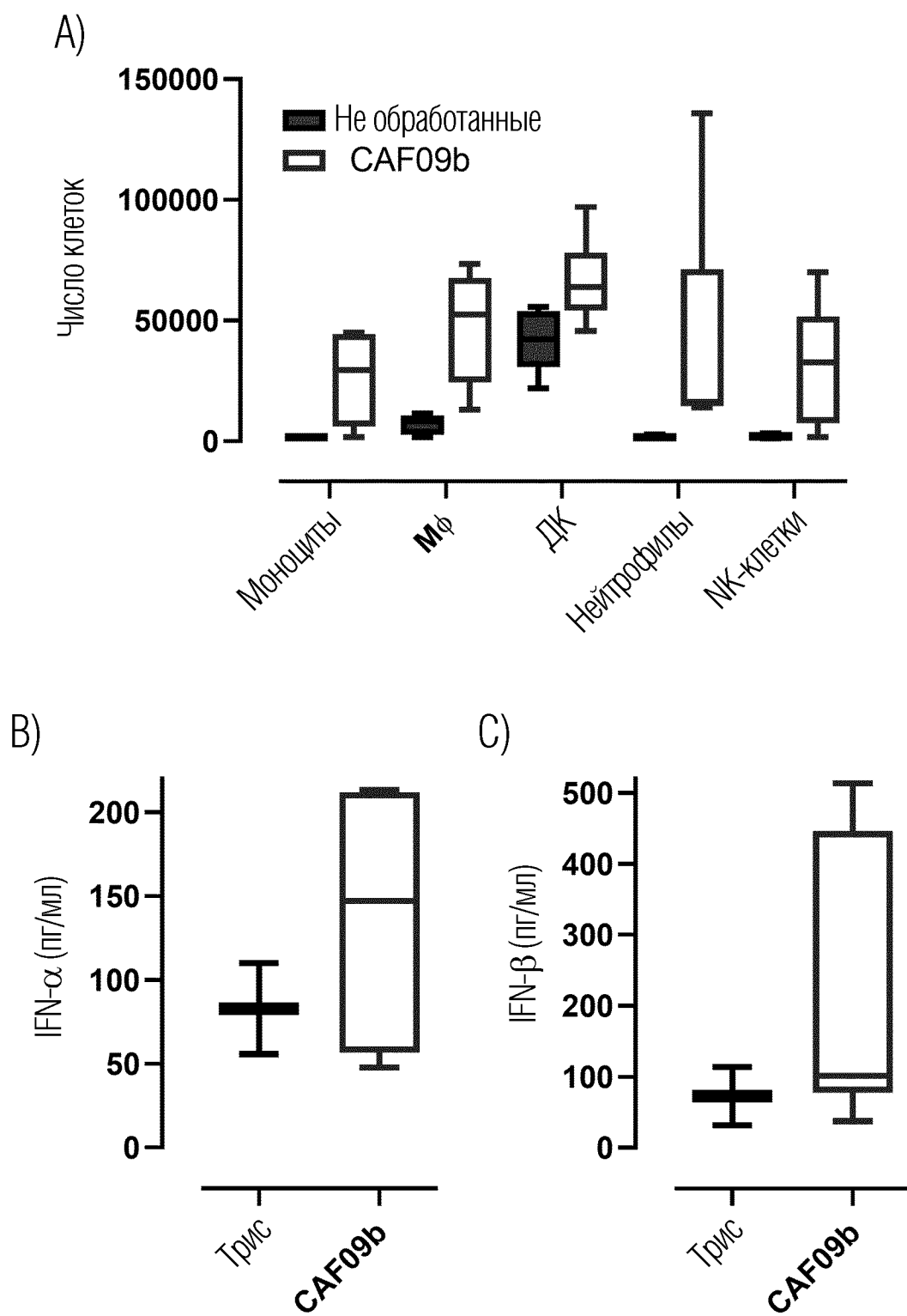
33. Липосомная композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, где индивидуум курил в прошлом или является курильщиком в настоящее время.

34. Устройство для интраназального введения, содержащее липосомную композицию по любому из предшествующих пунктов.

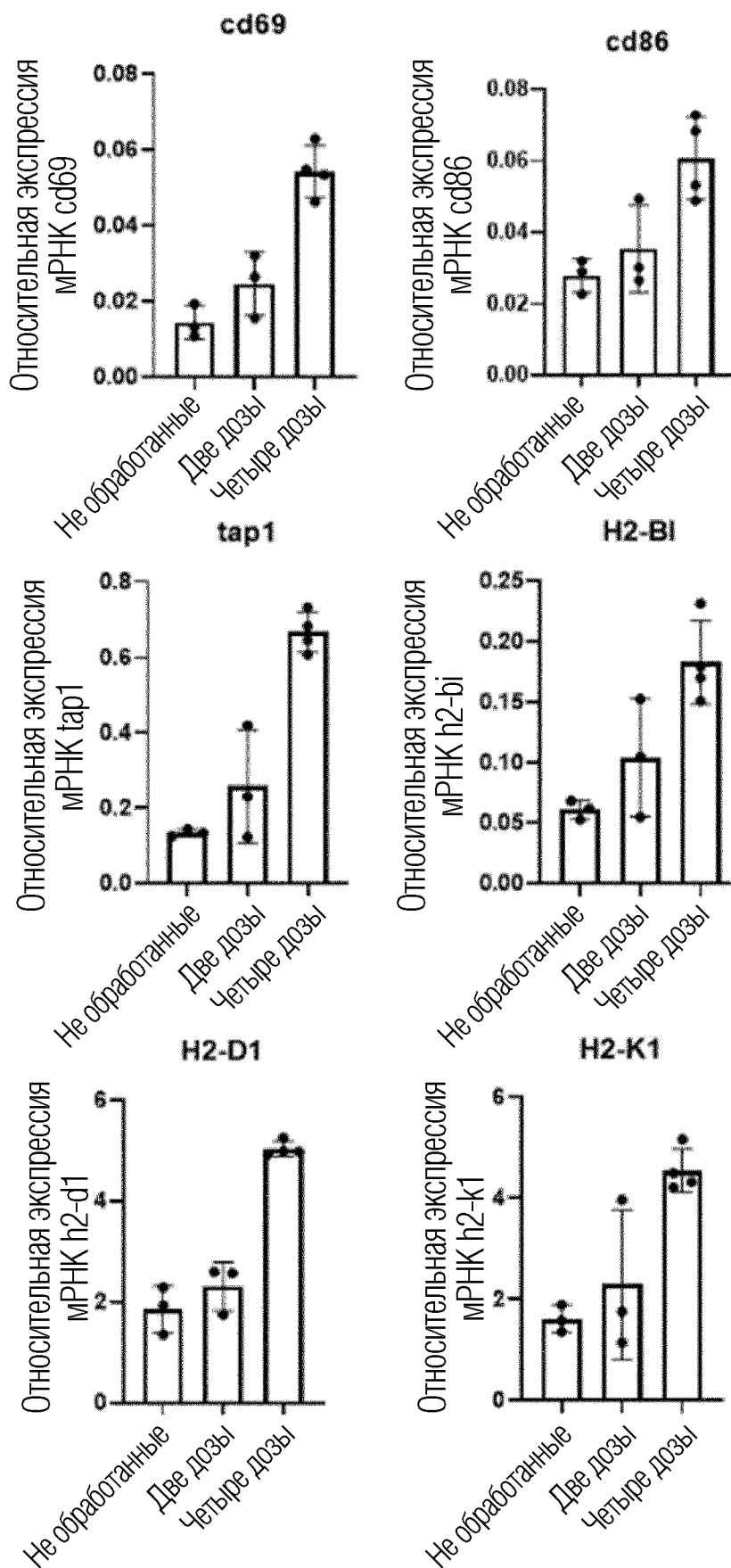
По доверенности



ФИГ. 1



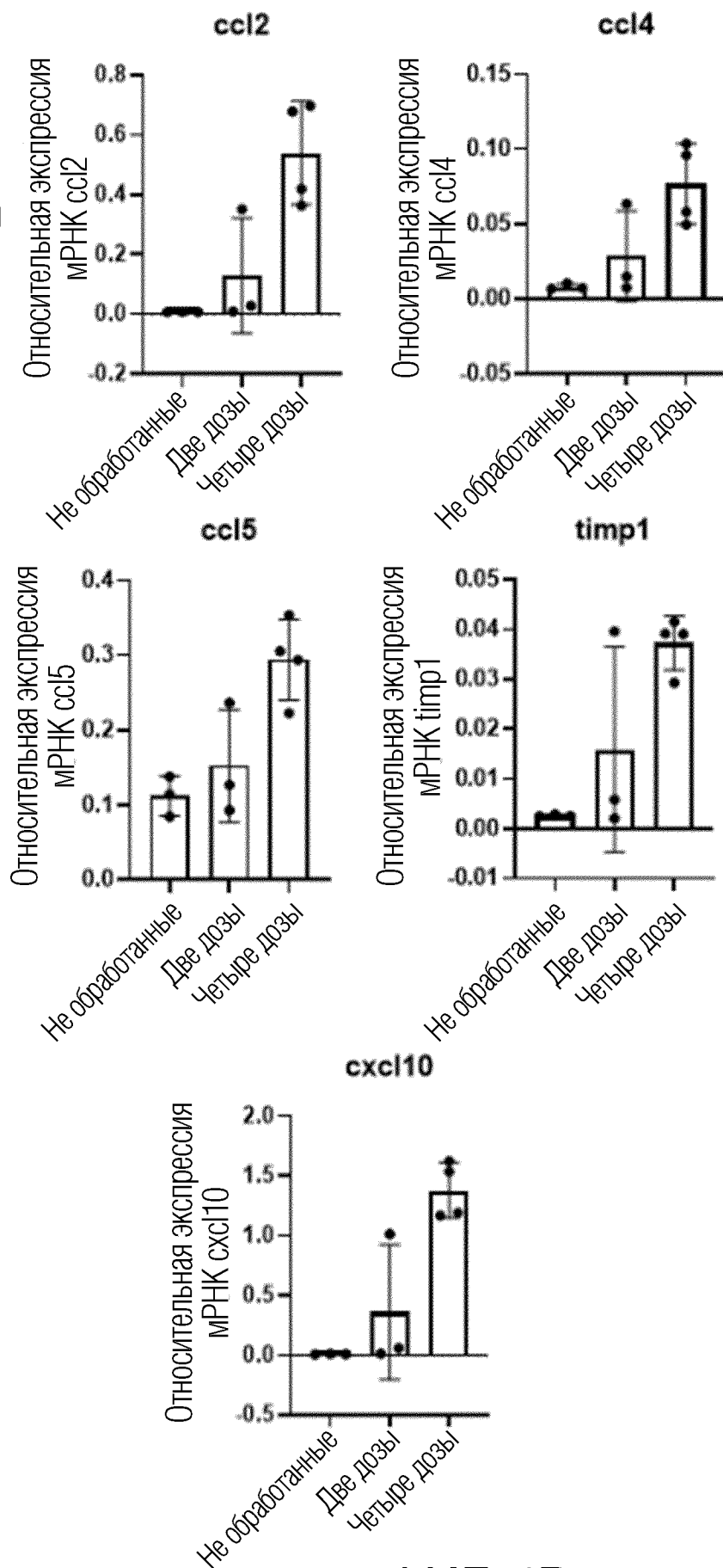
Маркеры активации поверхности



ФИГ. 4А

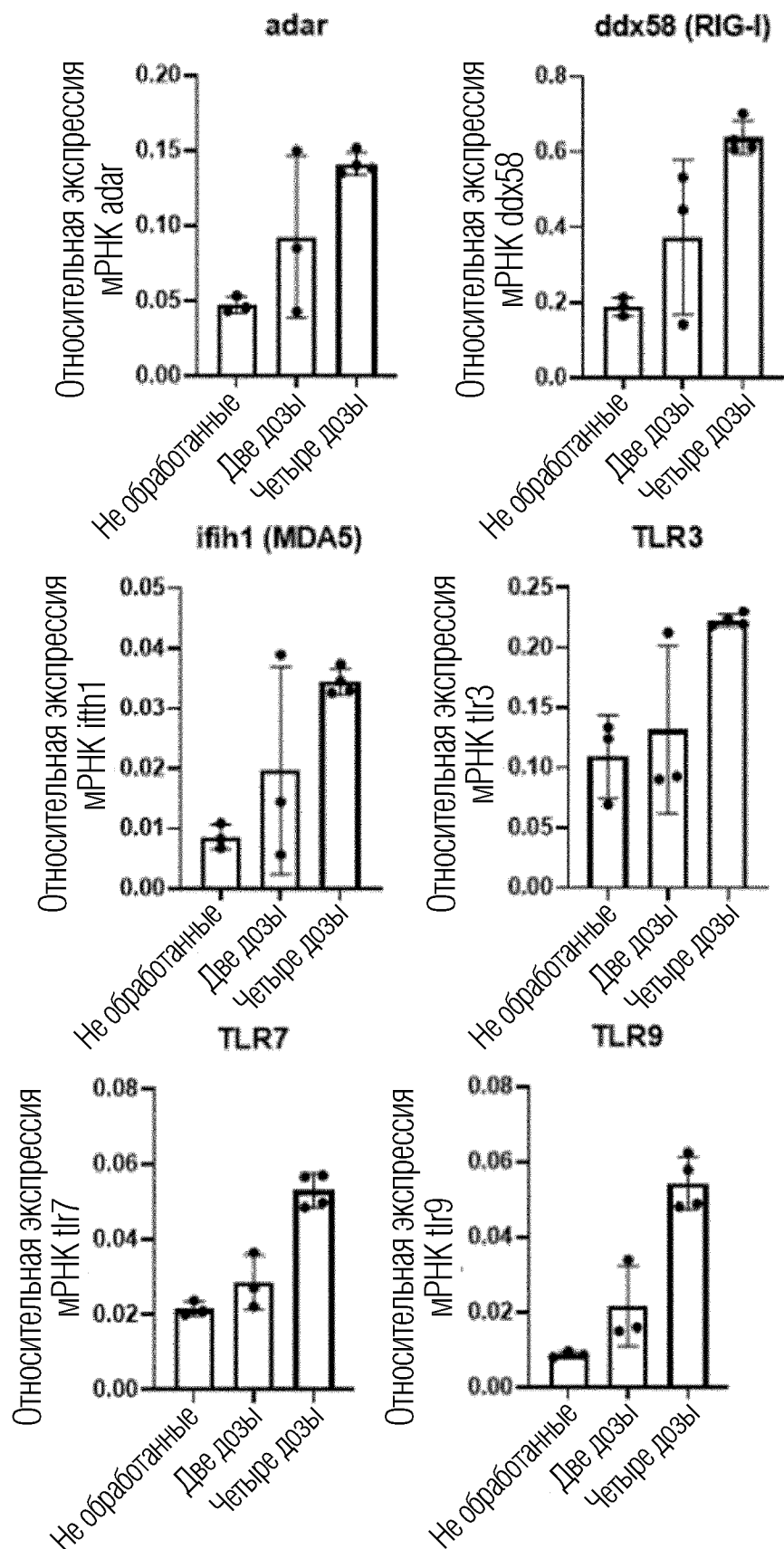
5/24

Секретированные
маркеры передачи
сигнала



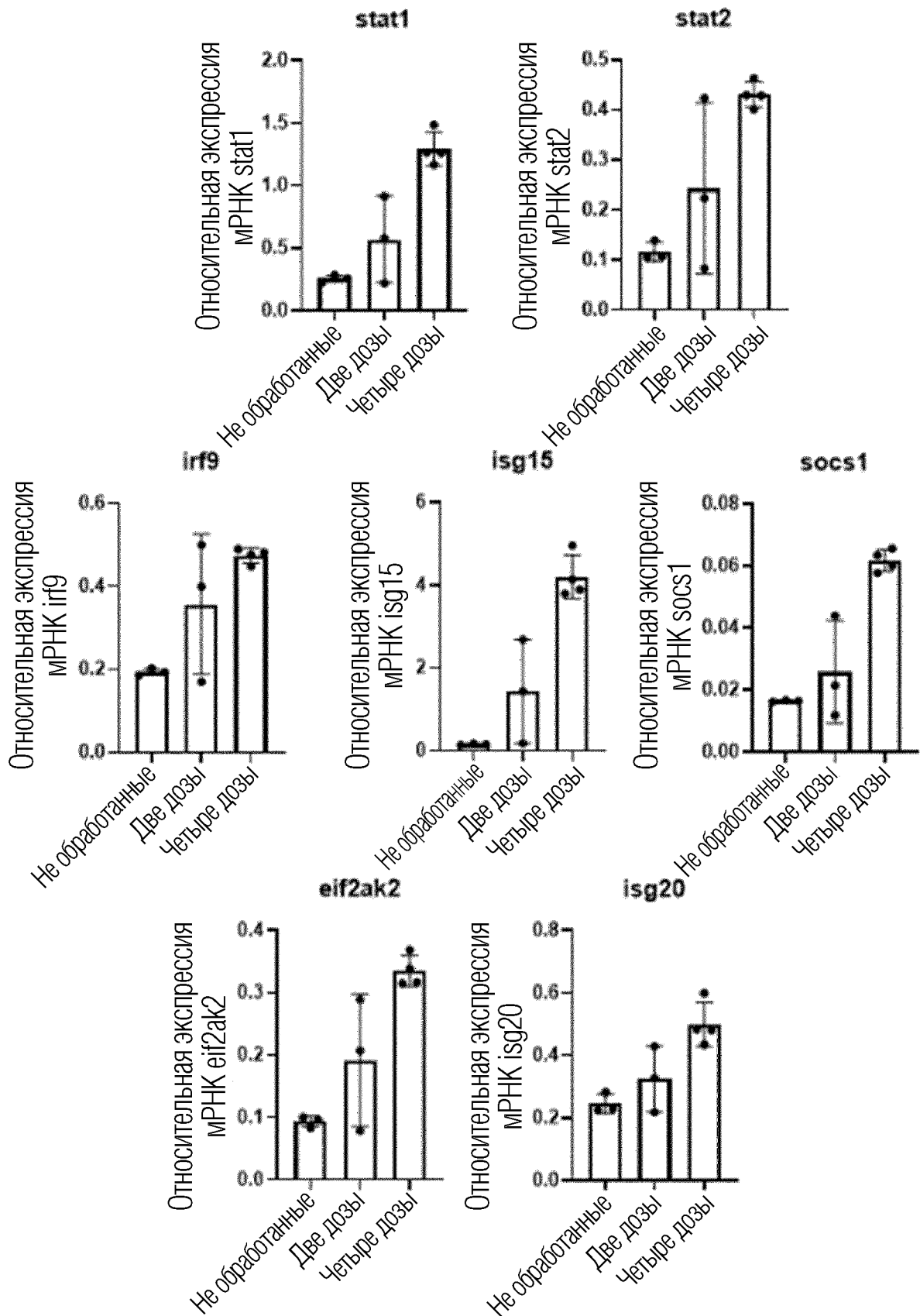
ФИГ. 4В

Рецепторы распознавания паттерна,
ассоциированного с IFN-I



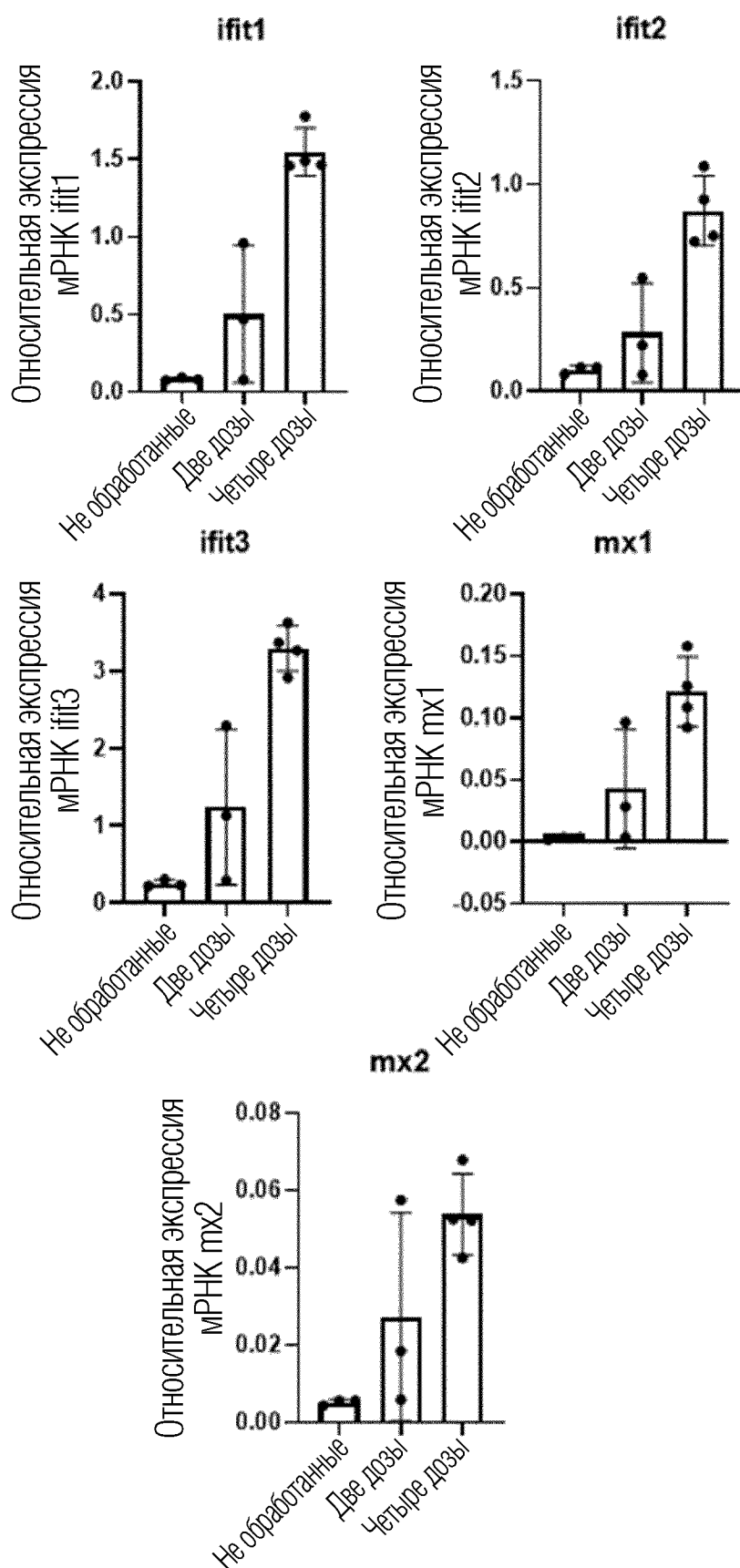
ФИГ. 4С

Гены, регулируемые IFN-I



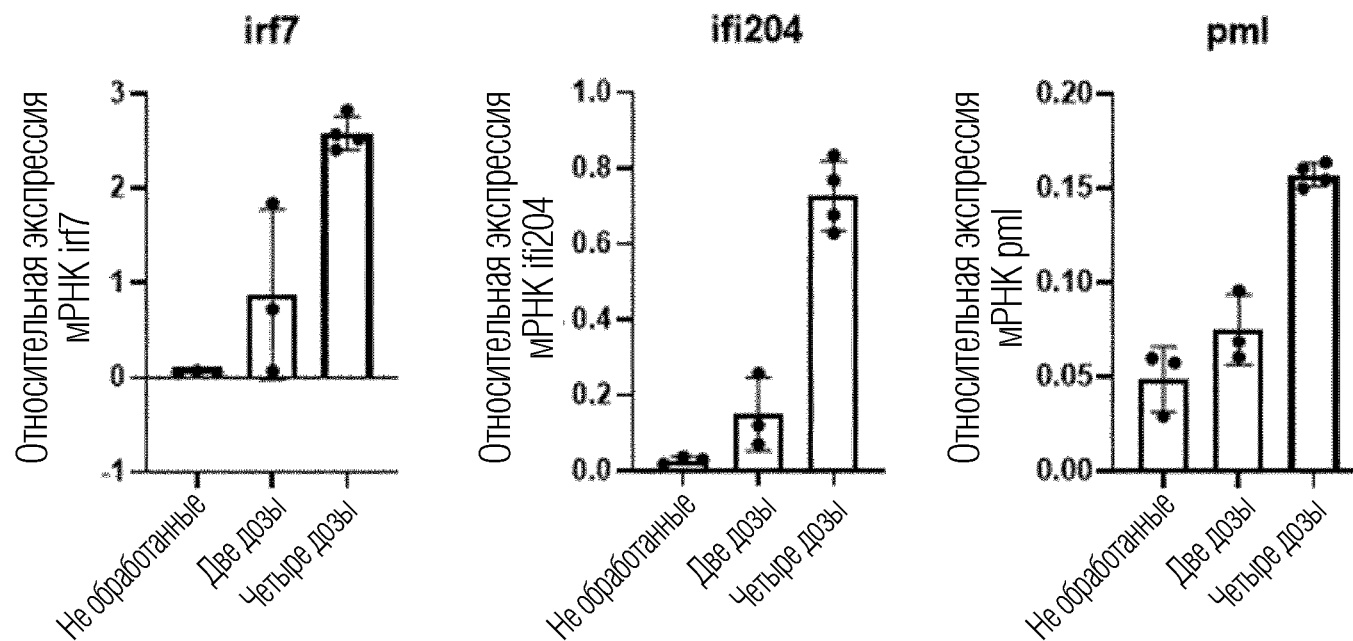
ФИГ. 4D

Ингибирование трансляции и репликации вируса



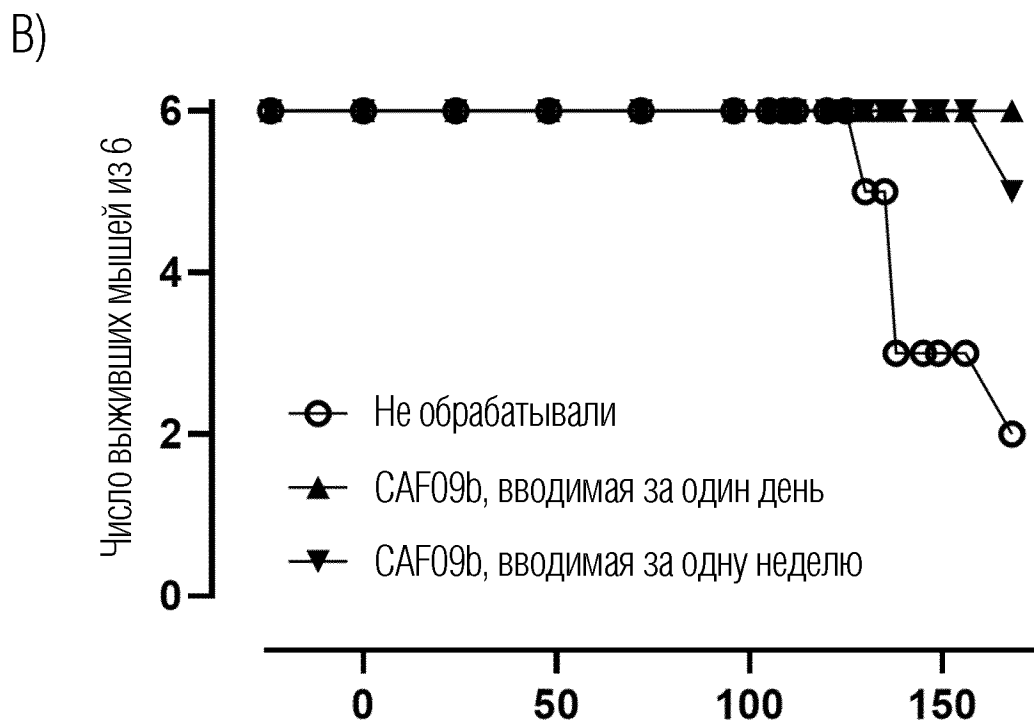
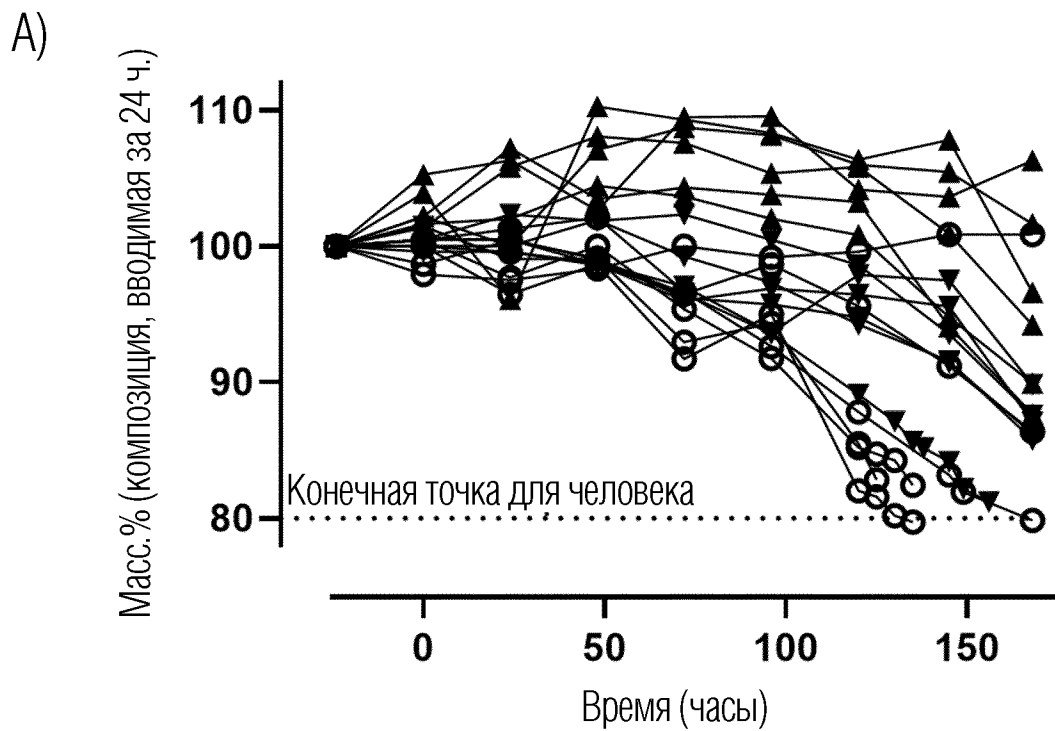
ФИГ. 4Е

Продукция IFN-I



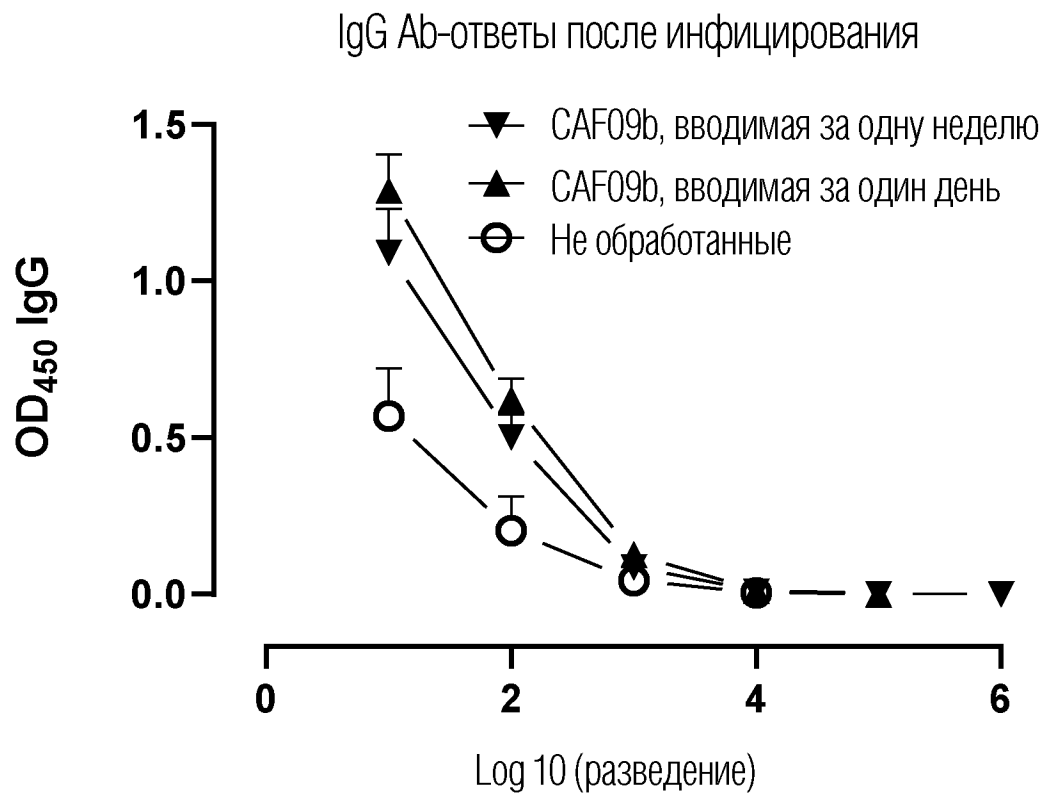
ФИГ. 4F

10/24



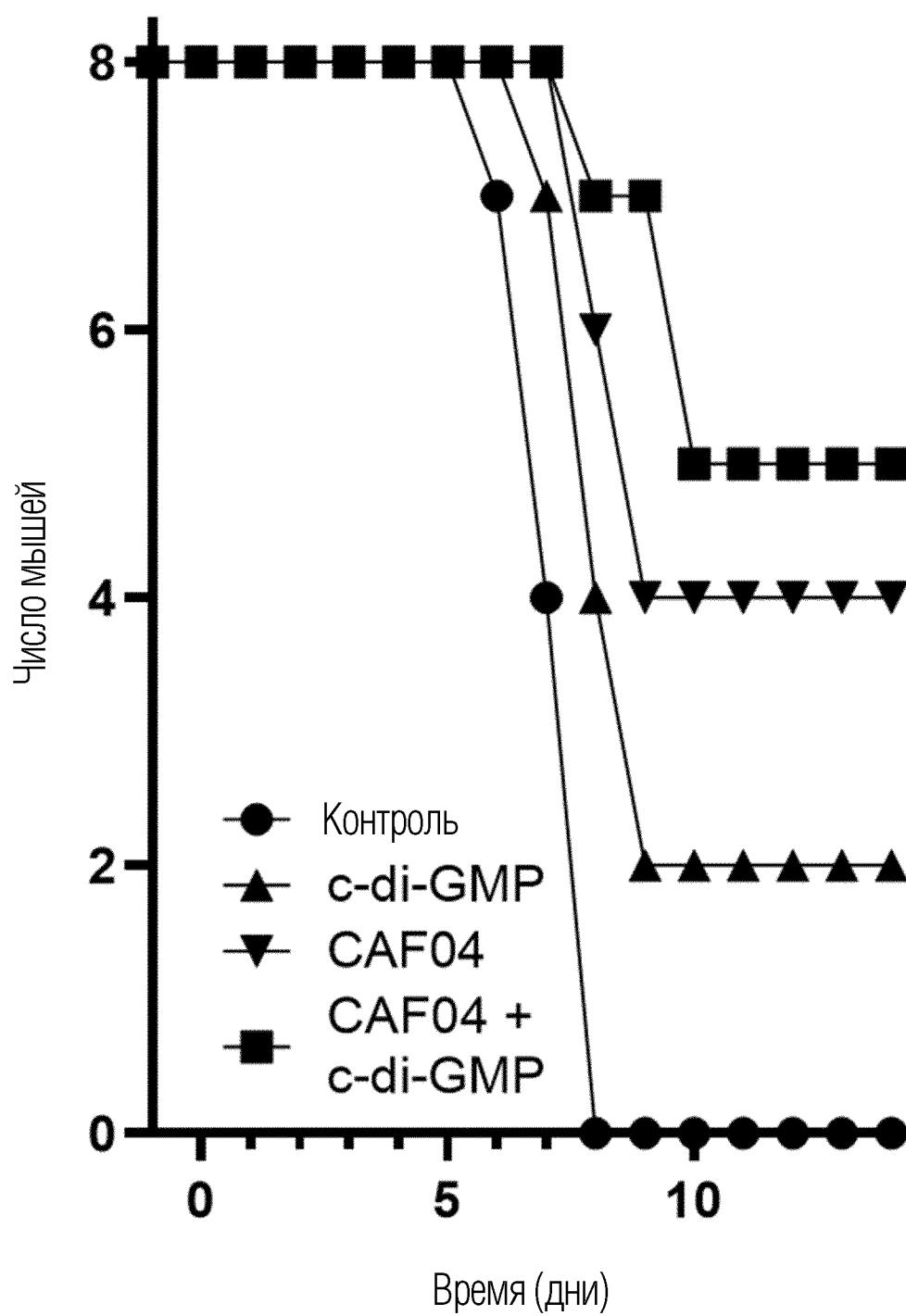
ФИГ. 5А-В

11/24

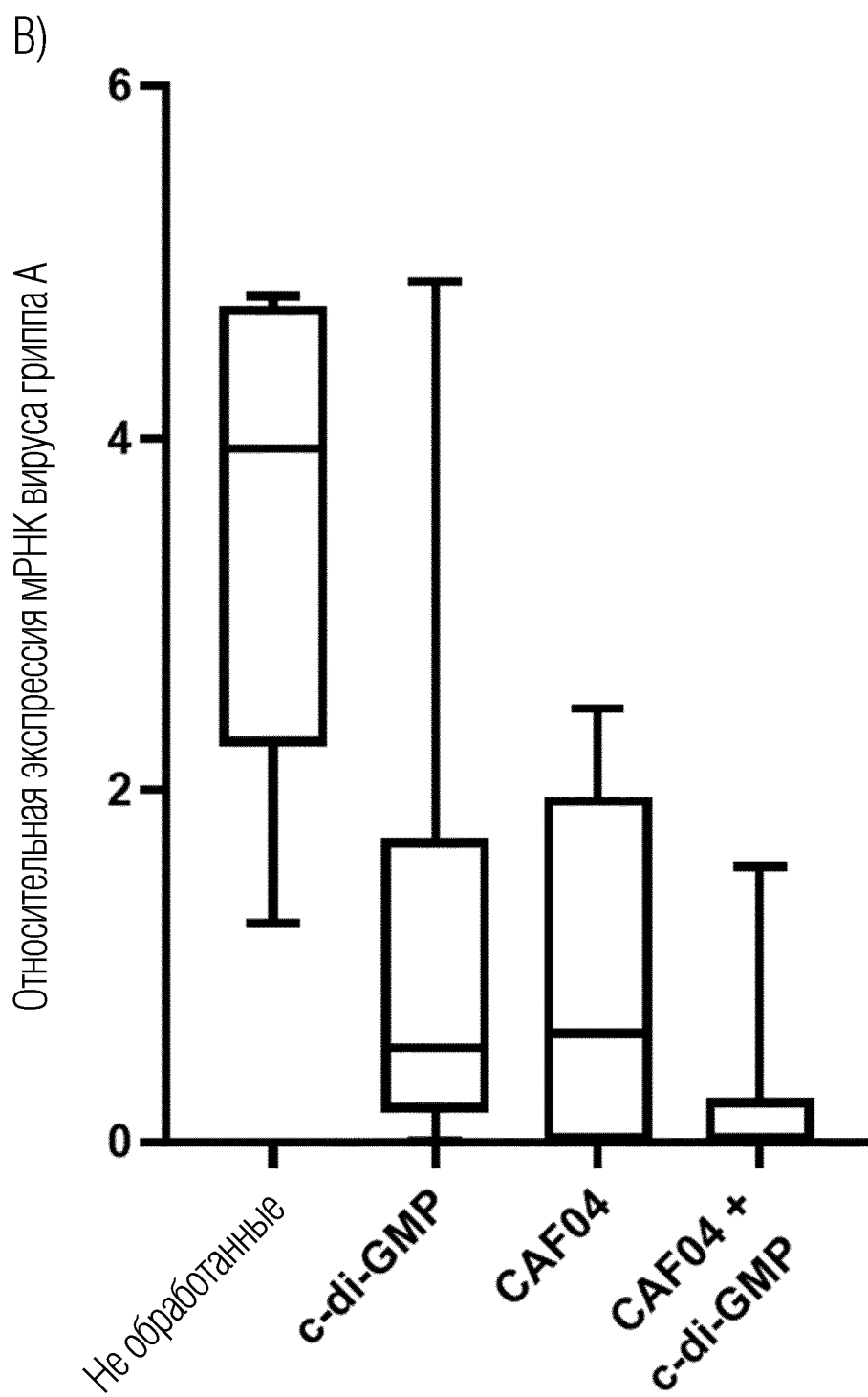


ФИГ. 6

A)



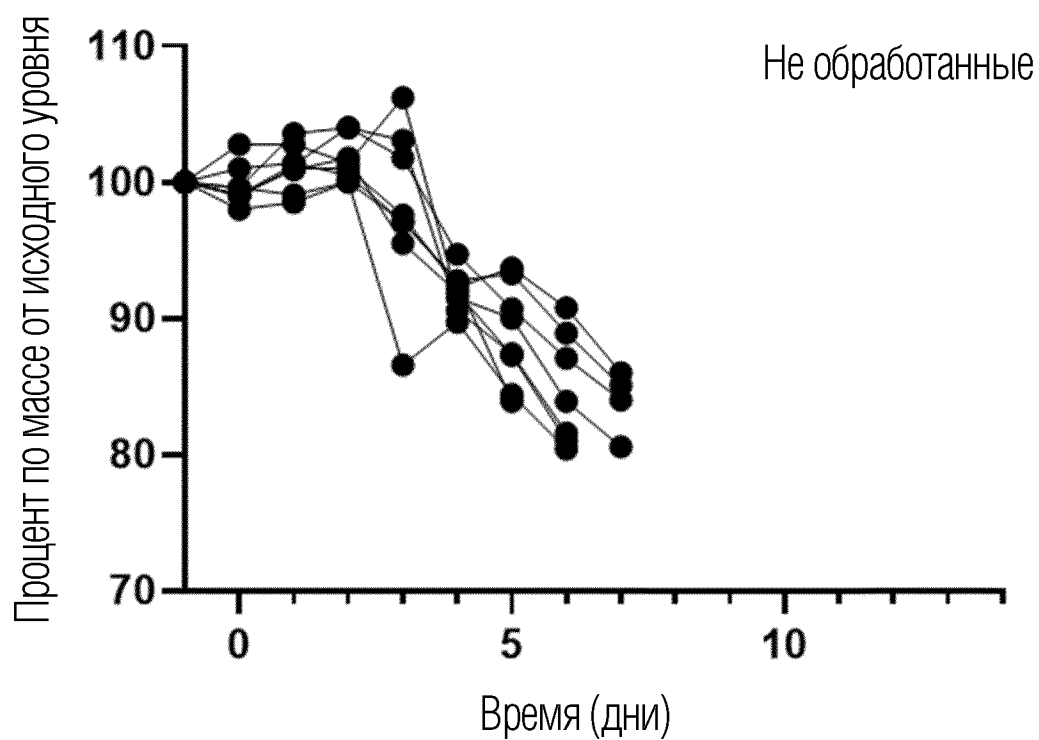
ФИГ. 7А



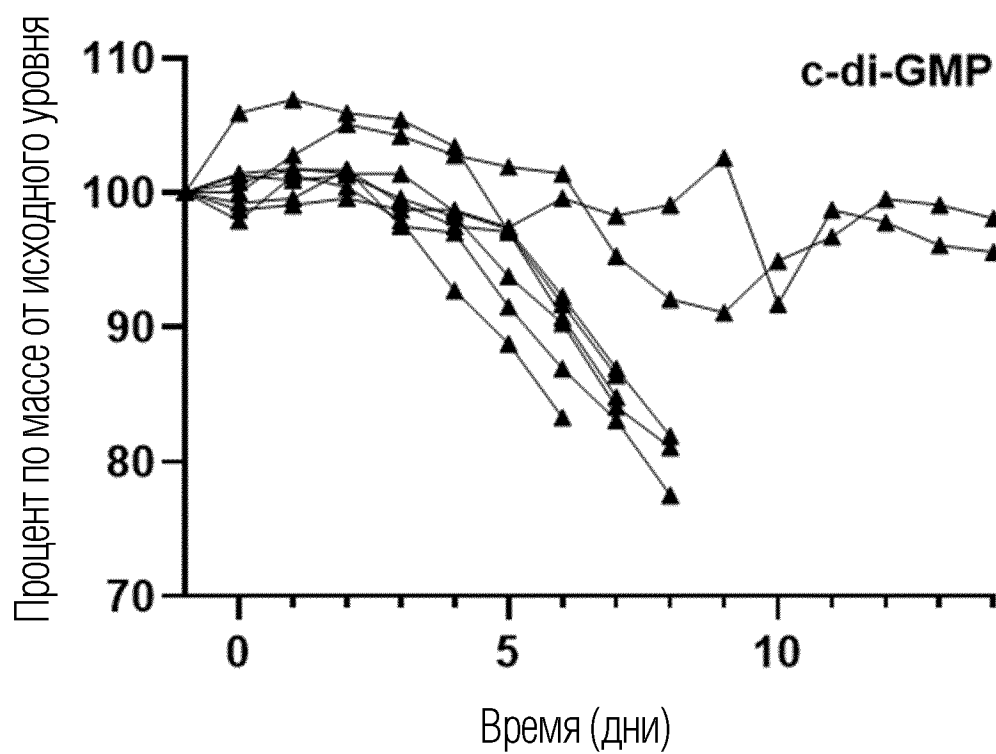
ФИГ. 7В

14/24

C)

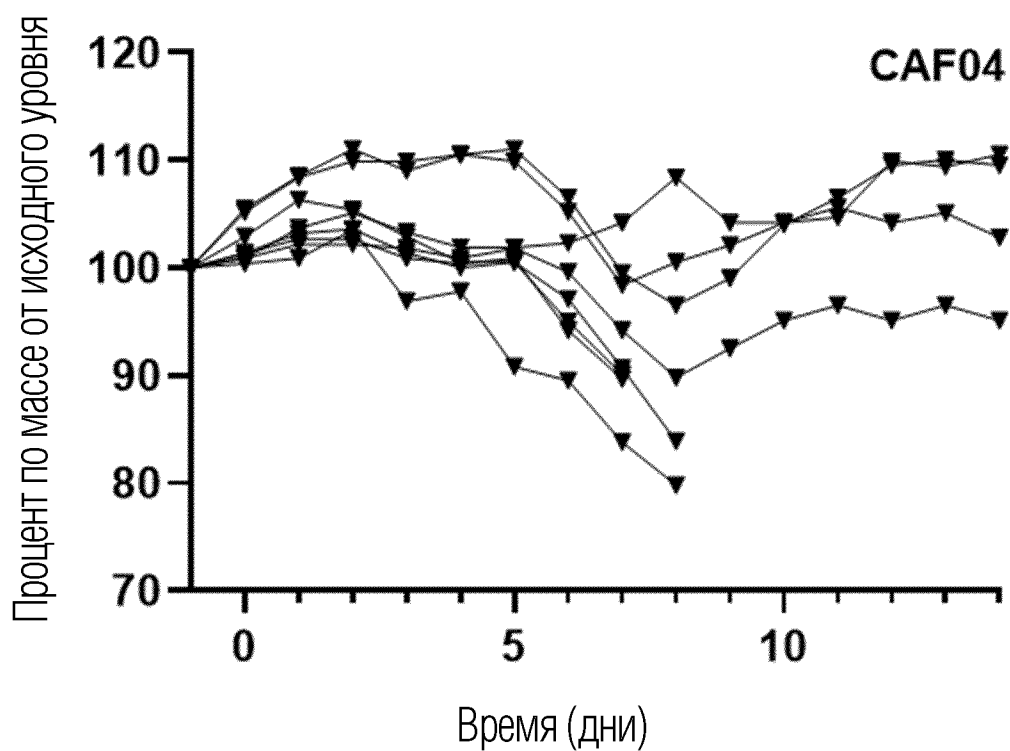


D)

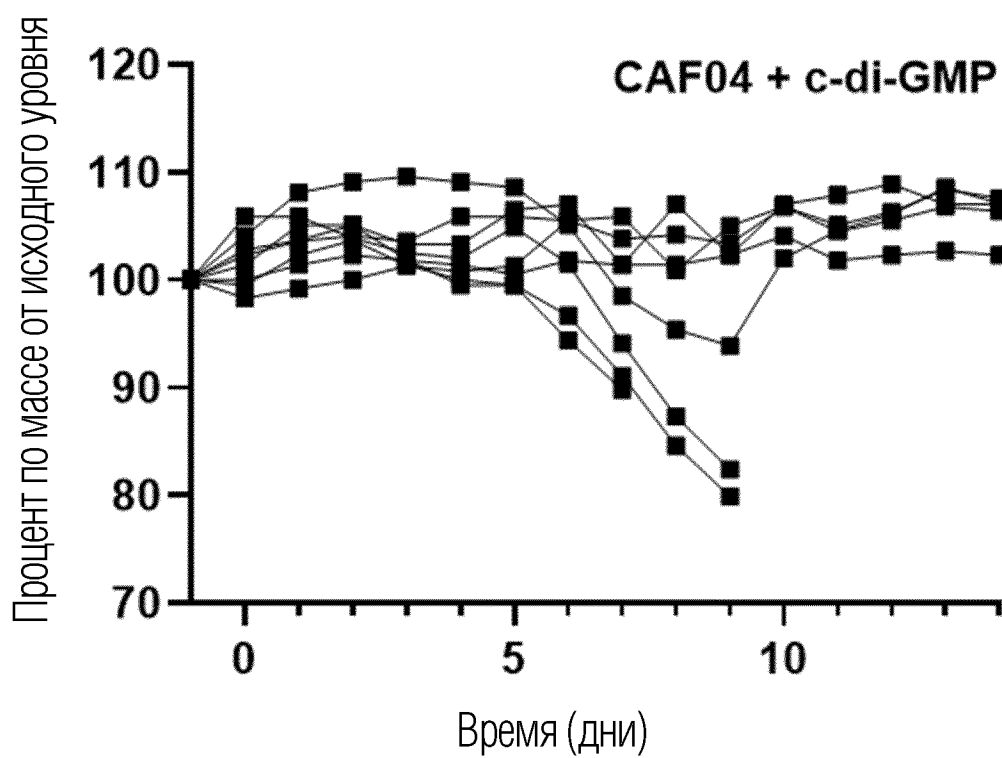


ФИГ. 7C+D

E)

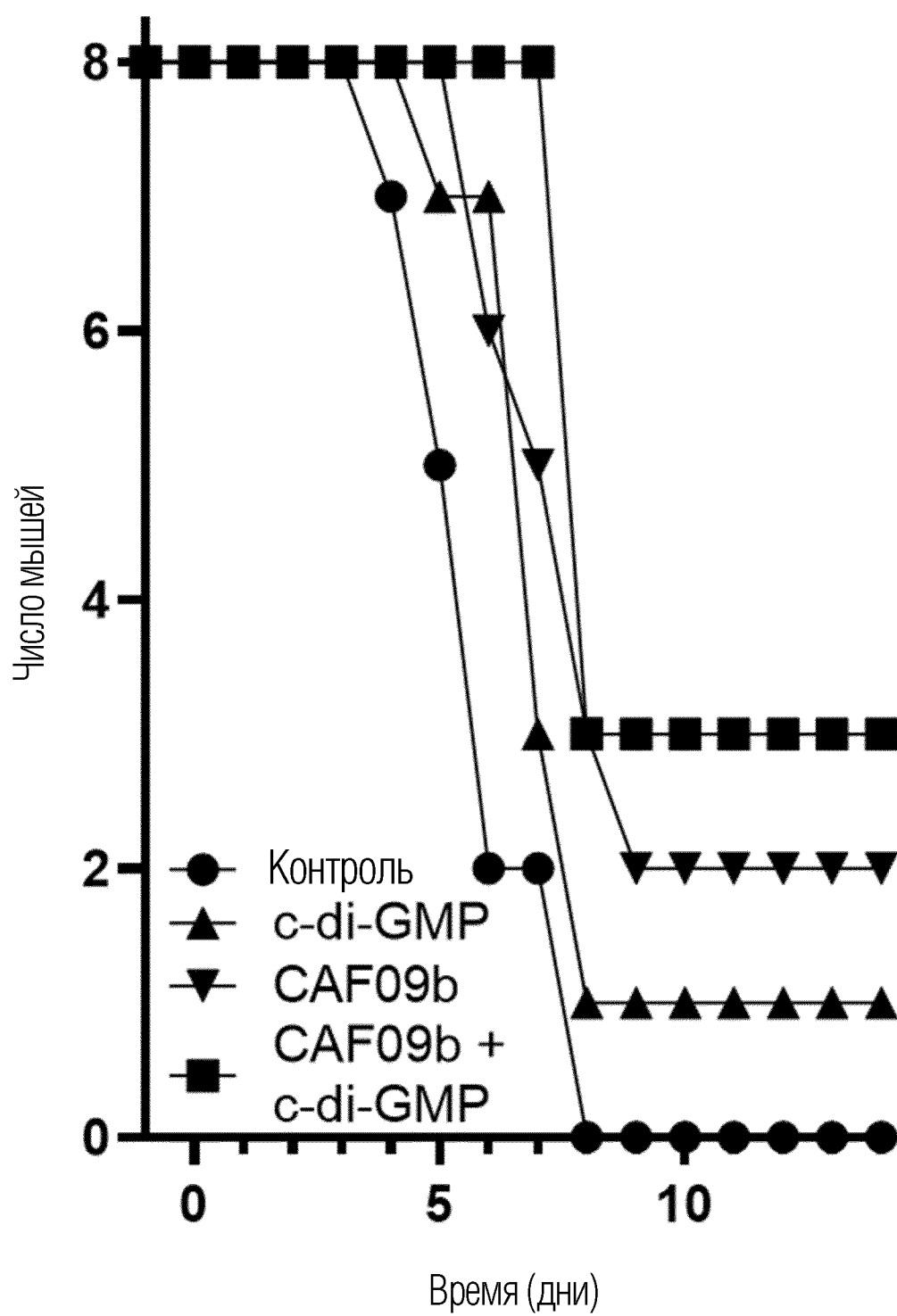


F)



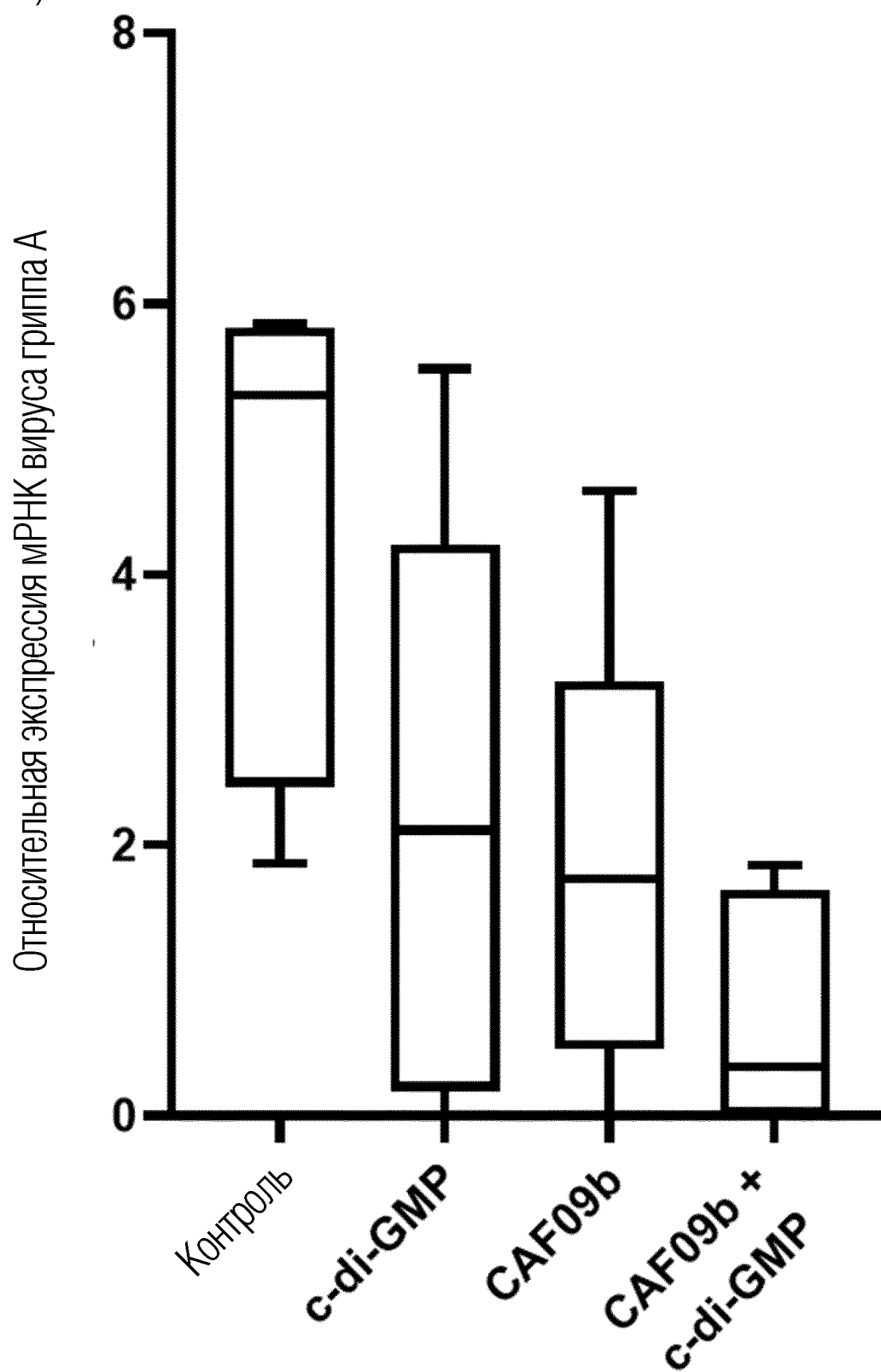
ФИГ. 7E+F

A)



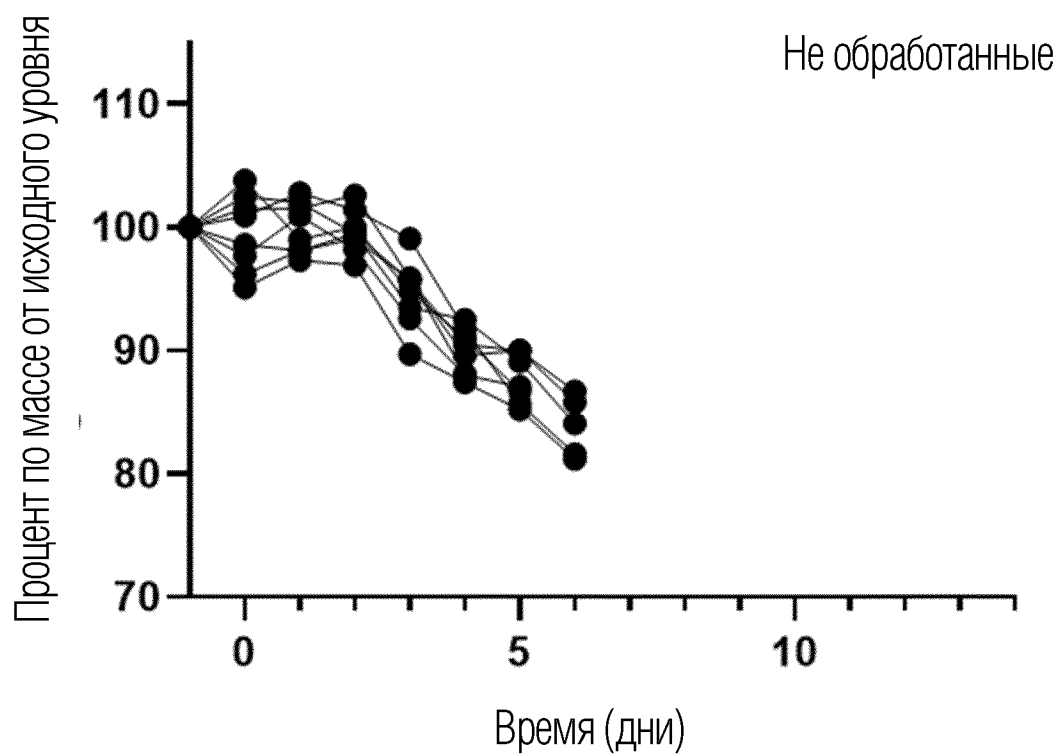
ФИГ. 8А

B)

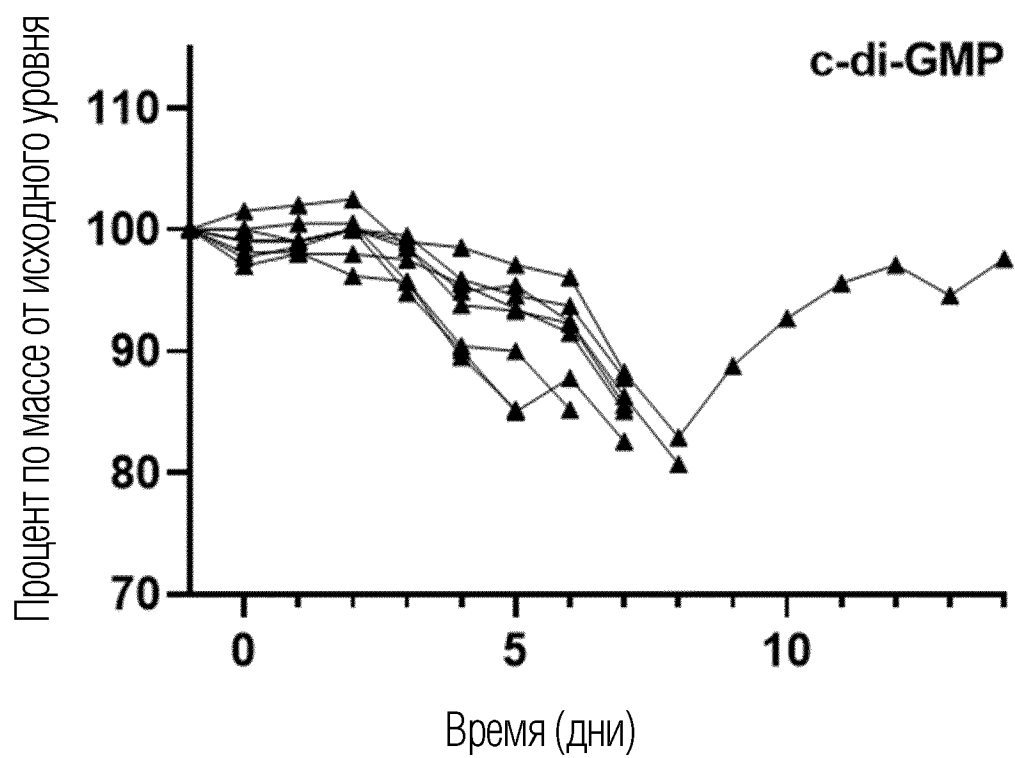


ФИГ. 8В

C)

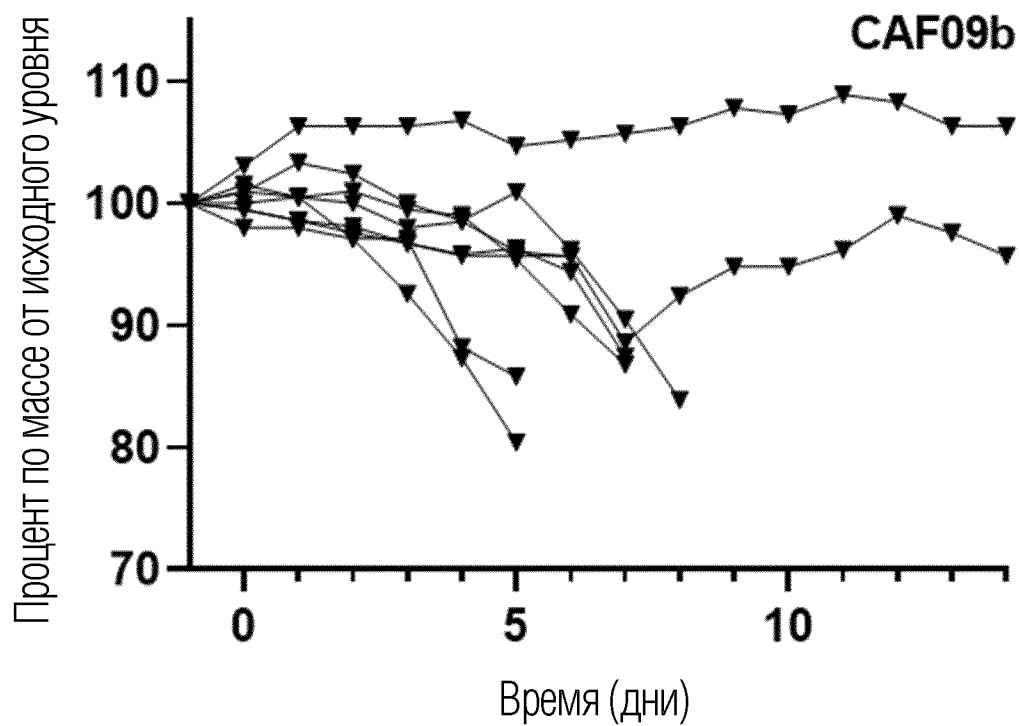


D)

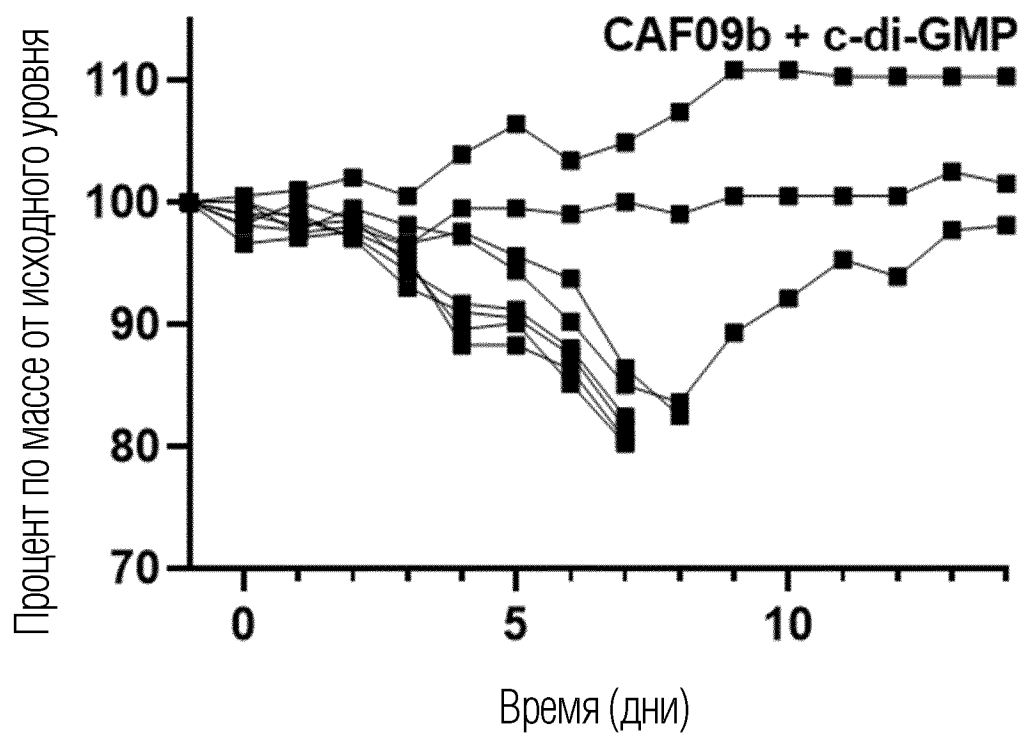


ФИГ. 8C+D

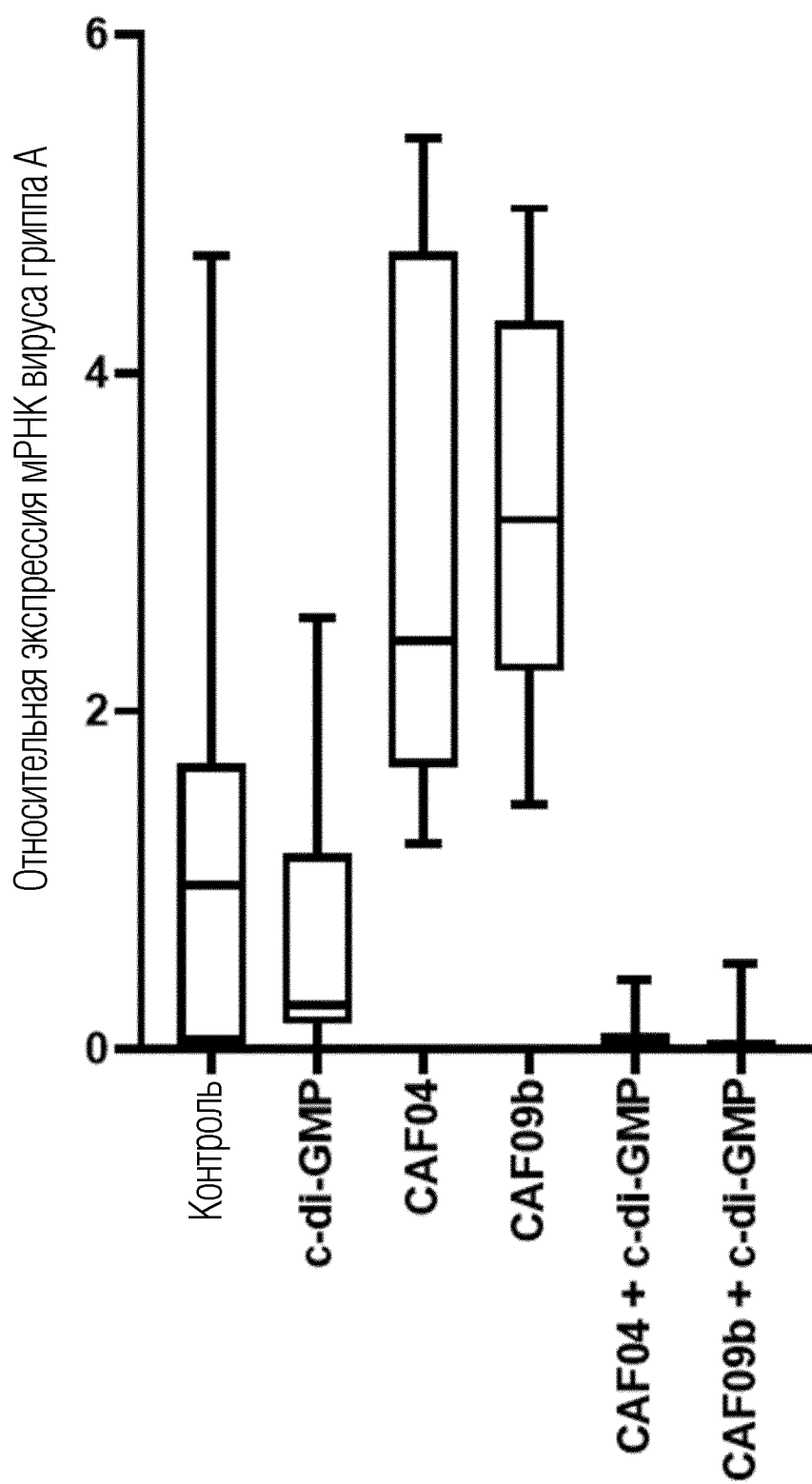
Е)



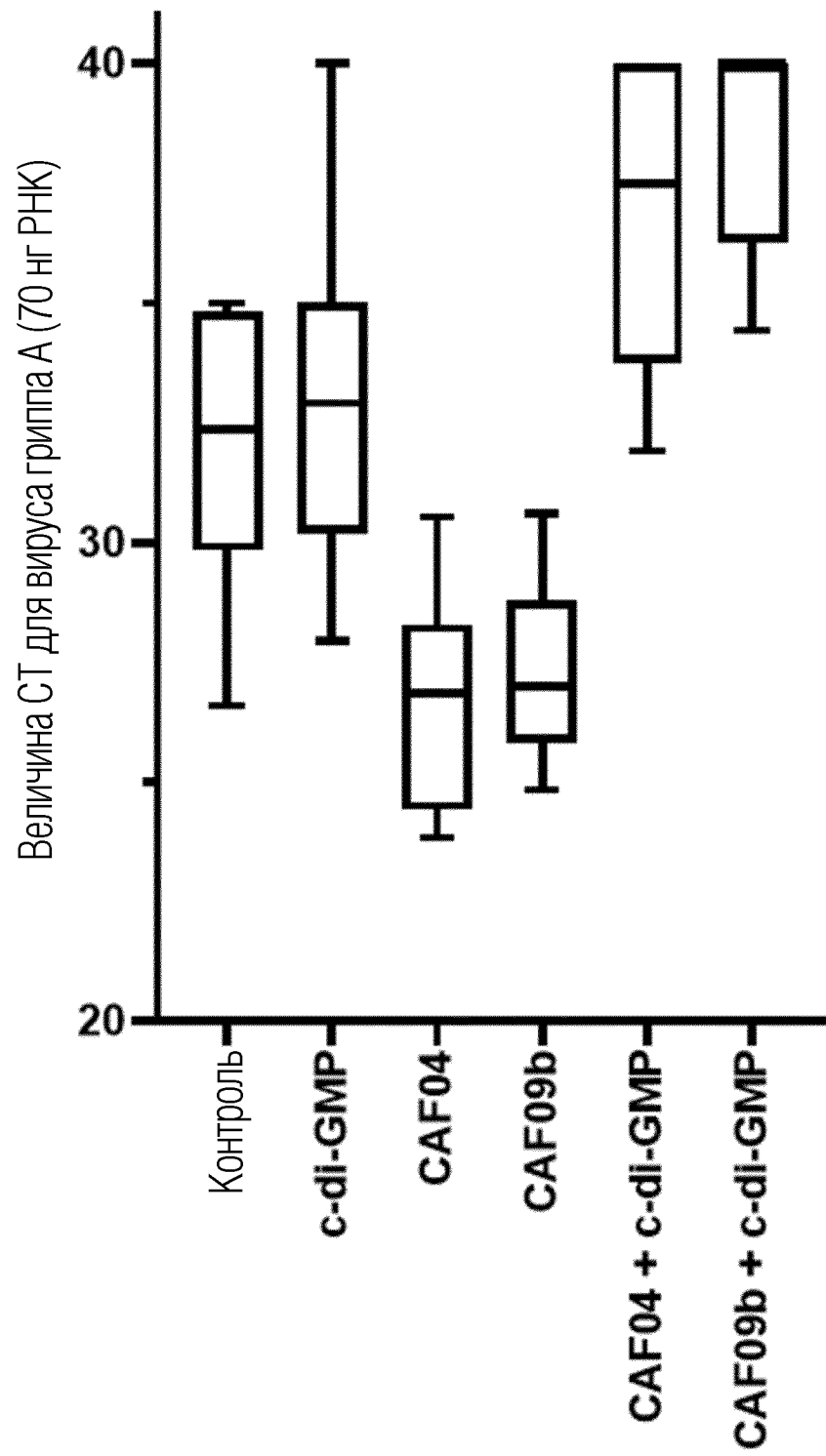
F)



ФИГ. 8Е+F

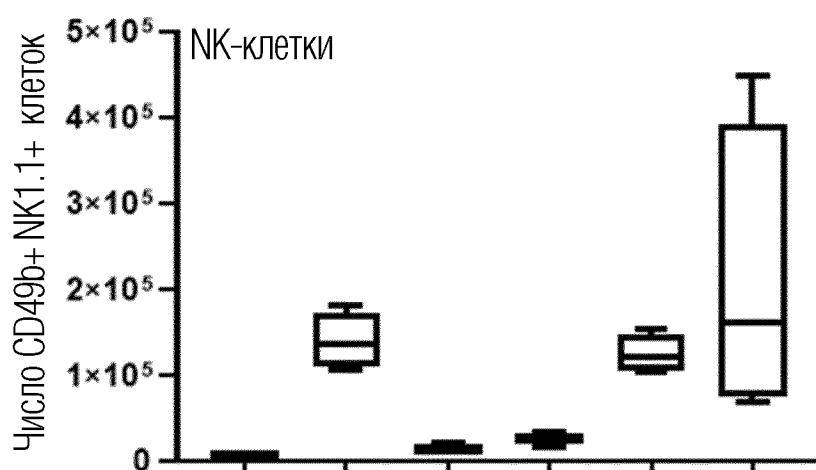


ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

C)



D)

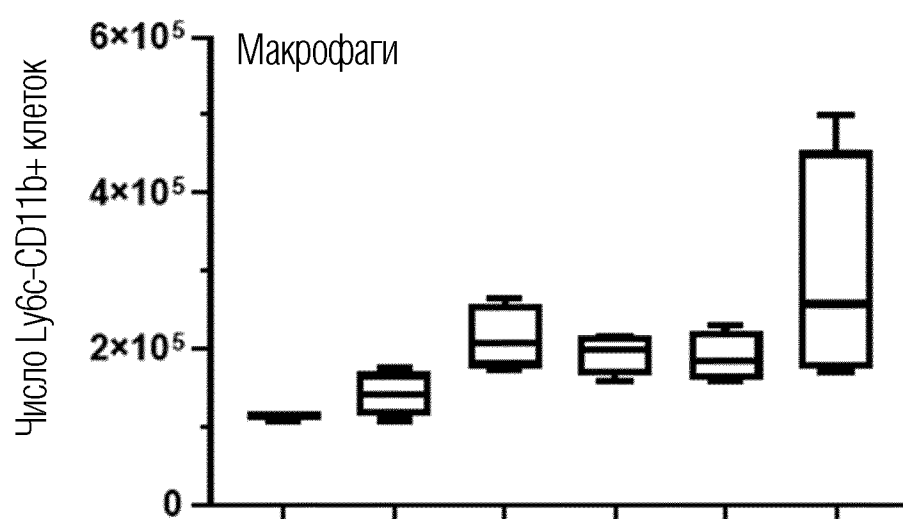


E)

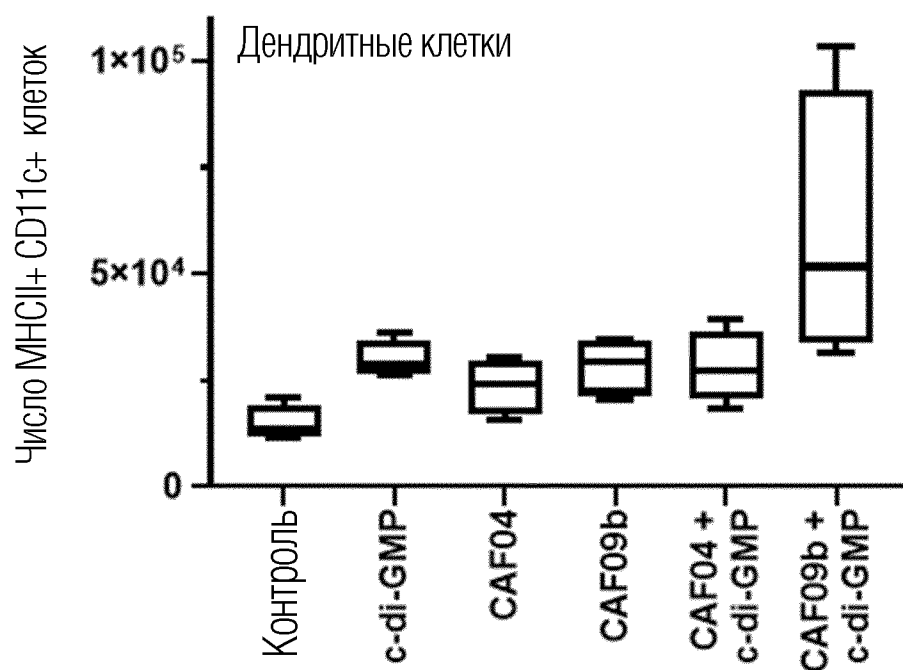


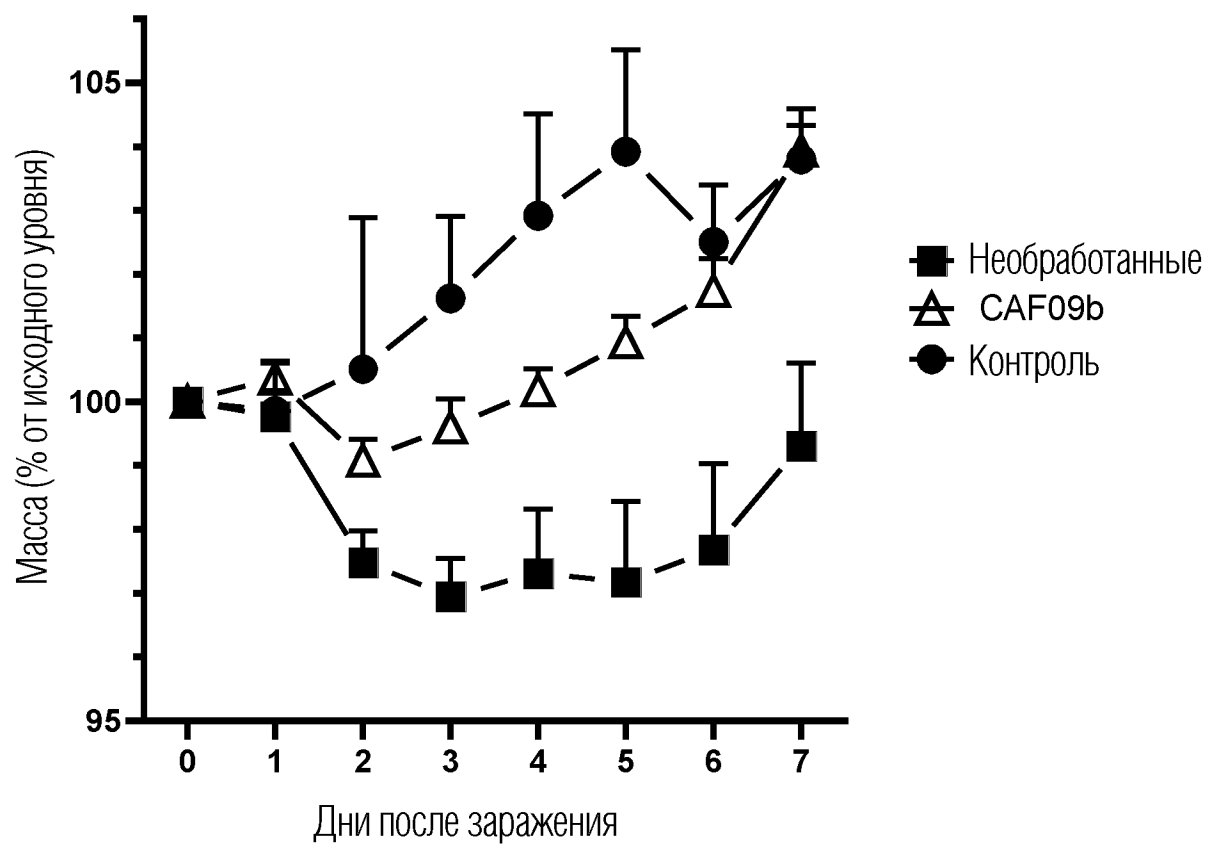
ФИГ. 9C+D+E

F)



G)





ФИГ. 10