

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042717**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.17

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 47/46 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990689

(22) Дата подачи заявки
2017.10.04

**(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛЫ АДЬЮВАНТА НА ОСНОВЕ
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

(31) **62/405,074**

(32) **2016.10.06**

(33) **US**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/IB2017/056131**

(87) **WO 2018/065923 2018.04.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭНДЖЕНАЙСИ МОЛЕКУЛАР
ДЕЛИВЕРИ ПТИ ЛТД (AU)**

(72) Изобретатель:
**Брахмбхатт Химаншу, Макдиармид
Дженнифер (AU)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-A1-20070298056

GLAS, MARTIN et al., "Targeting the
cytosolic innate immune receptors RIG-I and MDA5
effectively counteracts cancer cell heterogeneity in
glioblastoma", Stem Cells, 2013, Vol. 31, pages
1064-1074, See abstract; pages 1070, 1072; Figure 1C

US-A1-20150098897

US-A1-20120142079

GIACALONE, MATTHEW J. et al., "The use
of bacterial minicells to transfer plasmid DNA to
eukaryotic cells", Cellular Microbiology, 2006, Vol.
8, No. 10, pages 1624-1633, See abstract; pages
1629-1630

(57) Изобретение относится к композиции для доставки молекулы адьюванта на основе нуклеиновой кислоты в клетку-мишень. Композиция согласно настоящему изобретению содержит интактную бактериальную мини-клетку и фармацевтически приемлемый носитель для нее, при этом указанная мини-клетка содержит (i) по меньшей мере одну молекулу адьюванта на основе нуклеиновой кислоты или плазмиду, кодирующую указанный адьювант; (ii) по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

B1

042717

042717

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/405,074, поданной 6 октября 2016 г. Содержание этой заявки полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение в общем относится к области терапии на основе нуклеиновых кислот и, в частности, к доставке адъювантов на основе нуклеиновых кислот в клетки-мишени млекопитающих (например, Т-клеткам, дендритным клеткам) с использованием интактных мини-клеток бактериального происхождения. Изобретение особенно применимо для лечения рака, особенно в контексте стимуляции противоопухолевых иммунных ответов, и инфекций (например, вирусных инфекций).

Уровень техники

Следующее обсуждение предоставлено лишь для того, чтобы помочь читателю понять настоящее изобретение, и его не следует считать описывающим или представляющим собой предшествующий уровень техники для настоящего изобретения.

В последних успешных исследованиях был идентифицирован ряд нуклеиновых кислот, которые распознаются рецепторами клеток млекопитающих. Вовлечение рецепторов нуклеиновых кислот активирует врожденную иммунную систему несколькими путями. Например, связывание определенных нуклеиновых кислот (т.е. адъювантов на основе нуклеиновых кислот) с родственными (когнатными) рецепторами приводит к стимуляции выработки интерферонов (IFN) I и II типа. Эти интерфероны могут выполнять функцию адъювантов в усилении противоопухолевой активности иммунной системы (обзор приведен в источнике Junt and Barchet, 2015).

Помимо запуска внутренних клеточных и IFN-опосредованных эффекторных механизмов, агонисты сенсоров нуклеиновых кислот могут активировать дендритные клетки (ДК), способствуя секреции, созреванию цитокинов и презентации антигенов. Это, в свою очередь, усиливает и формирует качество адаптивных иммунных ответов. Благодаря своим иммуностимулирующим свойствам олигонуклеотидные или низкомолекулярные агонисты сенсоров нуклеиновых кислот применяются в клинических исследованиях для усиления иммунного ответа против слабоиммуногенных типов рака и в качестве адъювантов при терапевтической иммунизации против рака или в профилактических вакцинах против инфекций.

Был обнаружен ряд агонистов сенсоров нуклеиновых кислот, исследованных в качестве адъювантов для стимуляции противовирусного иммунитета или усиления противоопухолевой активности. Несмотря на перспективы применения этих агонистов сенсоров нуклеиновых кислот в качестве адъювантов, многие из них дошли до этапа фактических клинических исследований.

Это может быть связано с несколькими факторами. В частности, агонисты нуклеиновых кислот должны быть доставлены в конкретные клетки, такие как дендритные клетки, но эти молекулы не обладают свойствами, обеспечивающими хоуминг, чтобы способствовать локализации или проникновению в клетки-мишени. Кроме того, при введении *in vivo* свободные нуклеиновые кислоты нестабильны в сыворотке и могут быстро разлагаться нуклеазами. В результате адъюванты на основе нуклеиновых кислот и агонисты сенсоров нуклеиновых кислот рассматриваются как средства для местного применения или указанные средства должны быть ковалентно связаны с белковыми антигенами.

Таким образом, в данной области техники существует однозначная потребность в системе доставки, способной доставлять терапевтические адъюванты на основе нуклеиновых кислот и агонисты сенсоров нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Настоящее изобретение обеспечивает такую систему доставки.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе описаны композиции и способы лечения заболеваний с применением интактных мини-клеток бактериального происхождения, содержащих адъюванты на основе нуклеиновых кислот или агонисты сенсоров нуклеиновых кислот. В общем, предложенные (раскрытые) векторы доставки на основе мини-клеток выполняют свою функцию путем транспортировки адъювантов на основе нуклеиновых кислот или агонистов сенсоров нуклеиновых кислот в клетки-мишени, такие как Т-клетки или дендритные клетки, с целью вызвать иммунный ответ для помощи в борьбе с различными заболеваниями, включая рак и/или инфекции.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к композициям, содержащим (а) интактную мини-клетку, содержащую по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, плазмиду, содержащую сегмент, кодирующий по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, или агонист сенсора нуклеиновой кислоты; и (b) фармацевтически приемлемый носитель для нее, причем по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты или агонист рецептора нуклеиновой кислоты инициирует иммунный ответ клетки-мишени.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способам доставки адъюванта на основе нуклеиновой кислоты или агониста сенсора нуклеиновой кислоты в клетку-мишень, включающим приведение клетки-мишени в контакт с интактной мини-клеткой, содержащей (i) по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты; (ii) плазмиду, состоящую из сегмента, кодирующего по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты; или (iii) по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты, где клетка-мишень поглощает мини-клетку.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способам лечения заболевания у субъекта, включающим введение субъекту, имеющему заболевание, интактной мини-клетки, содержащей (i) по меньшей мере одну молекулу адьюванта на основе нуклеиновой кислоты; (ii) плазмиду, содержащую сегмент, кодирующий по меньшей мере одну молекулу адьюванта на основе нуклеиновой кислоты; или (iii) по меньшей мере один агонист рецептора нуклеиновой кислоты, где мини-клетка поглощается клеткой-мишенью после введения.

В некоторых вариантах реализации иммунный ответ, вызываемый в клетках-мишенях, включает выработку интерферона I типа, включая интерферон- α и/или интерферон- β .

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты включает нуклеиновую кислоту, которая связывается по меньшей мере с одним из TLR (толл-подобного рецептора) 3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I (гена 1, индуцируемого ретиноевой кислотой), MDA5 (белка 5, ассоциированного с дифференцировкой меланомы), AIM2 (белка 2, отсутствующего в клетках меланомы), cGAS (цикло-ГМФ-АМФ-синтазы) или IFI16 (IFN γ -индуцируемого белка 16).

В некоторых вариантах реализации интактная мини-клетка содержит по меньшей мере два адьюванта на основе нуклеиновой кислоты. В других вариантах реализации по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты содержит последовательность по меньшей мере из приблизительно 40 нуклеотидов, например, по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты может представлять собой 40-мерную или 50-мерную двухцепочечную РНК или ДНК.

В некоторых вариантах реализации интактная мини-клетка содержит адьювант на основе нуклеиновой кислоты и агонист сенсора нуклеиновой кислоты, а в некоторых вариантах реализации по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты включает полинуклеотидный продукт PNPase1, поли(I:C) (полиинозиновой-полицитидиловой кислоты), поли-ICLC, имиквимода, имидазохинолина ризиквимода, CpG-ODN (CpG-олигодеоксинуклеотидов) или 2'3'-циклического GAMP (ГМФ-АМФ).

В некоторых вариантах реализации раскрытые мини-клетки могут дополнительно содержать биспецифический лиганд. В некоторых вариантах реализации биспецифический лиганд может содержать первое плечо, несущее специфичность к структуре поверхности мини-клетки, и второе плечо, несущее специфичность к рецептору поверхности нефагоцитарной клетки млекопитающего. Например, структура поверхности мини-клетки может представлять собой О-полисахаридный компонент липополисахарида на поверхности мини-клетки, и рецептор поверхности клетки млекопитающего может быть способен активировать рецептор-опосредованный эндоцитоз или макропиноцитоз мини-клетки. В некоторых вариантах реализации биспецифический лиганд содержит антитело или фрагмент антитела.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^7 мини-клеток, на 10^8 мини-клеток, на 10^9 мини-клеток, на 10^{10} мини-клеток или на 10^{11} мини-клеток.

В некоторых вариантах реализации плазмиды, кодирующей адьювант на основе нуклеиновой кислоты, содержит регуляторный элемент, функционально связанный с сегментом, кодирующим по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты, и в некоторых вариантах реализации плазмиды кодирует несколько молекул адьювантов на основе нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах реализации клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего, такую как иммунная клетка человека. Например, клетка-мишень может представлять собой моноцитарную клетку, макрофаг, Т-клетку или дендритную клетку, или НК-клетку, или iNKT-клетку. В некоторых вариантах реализации клетка-мишень является компетентной в отношении фагоцитоза, эндоцитоза или макропиноцитоза.

В некоторых вариантах реализации контакт между мини-клеткой и клеткой млекопитающего может происходить *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации заболевание, подлежащее лечению, может представлять собой рак или инфекцию.

В некоторых вариантах реализации введение раскрытой мини-клетки может дополнительно включать введение субъекту лекарственного средства для лечения заболевания, такого как химиотерапевтическое, или противовирусное, или антибактериальное средство. В этих вариантах реализации лекарственное средство также может быть упаковано в интактную мини-клетку. В некоторых вариантах реализации лечение может дополнительно включать радиационную терапию.

Вышеизложенное общее описание и нижеследующее подробное описание являются иллюстративными и пояснительными, и не являются ограничивающими объем настоящего изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны эндосомальный и цитозольный пути распознавания нуклеиновой кислоты (адаптированы из источника Junt and Barchet, 2015). На фигуре представлены некоторые из основных путей распознавания нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе.

Сокращения включают: cGAMP = циклический ГМФ-АМФ; cGAS = cGAMP-синтаза; ДК = дендритная клетка; дцРНК = двухцепочечная РНК; ЭПР = эндоплазматический ретикулум; IL = интерлейкин; IRAK = IL-1 рецептор-ассоциированная киназа; IRF = регуляторный фактор IFN; MAVS = митохондри-

альный противовирусный сигнальный белок; MDA5 = белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы; MYD88 = белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88; NF-κB = ядерный фактор "каппа-би"; пДК = плазмидоидная ДК; RIG-I = ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой; оцРНК = одноцепочечная РНК; STING = стимулятор генов IFN; TBK1 = TANK-связывающая киназа 1; TRIF = TIR домен-содержащий адаптерный белок, индуцирующий IFNβ; и XCR1 = рецептор хемокина XC 1 типа.

На фиг. 2 показан путь распознавания нуклеиновой кислоты в ядре (адаптирован из источника Diner, Lumm, and Christea, 2015). После проникновения двухцепочечной чужеродной ДНК в клетку-хозяина она связывается непосредственно с сенсорами ДНК IFI16 и IFIX (1). IFI16 передает сигналы STING посредством механизма, который еще предстоит выяснить (2). После активации и димеризации STING TBK-1 фосфорилируется (3), что приводит к фосфорилированию IRF3 и NF-κB (4), которые транслируются обратно в ядро, вызывая экспрессию цитокинов (5).

На фиг. 3 показаны результаты исследования *in vivo*, сравнивающего эффективность мини-клеток с упакованным лекарственным средством по отдельности с комбинированным лечением мини-клетками с упакованным лекарственным средством (PNU159682) и адьювантом на основе нуклеиновой кислоты (40-мер), на мышинной модели ксенотрансплантата опухоли. Как показано на фигуре, мыши, получавшие ^{EGFR}мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетки_{40-мер} (группа 3), продемонстрировали очень значительную регрессию опухоли на 44 день после введения в общей сложности 6 доз, в то время как мыши, получавшие только ^{EGFR}мини-клетки_{PNU-159682} (группа 2), были просто стабильны. Группа 1 представляет собой контрольных мышей, получавших только физиологический раствор.

На фиг. 4 показаны результаты сравнения противоопухолевой эффективности 40- и 50-мерных адьювантов на основе нуклеиновых кислот на мышинной модели ксенотрансплантата. Группа 1 (контрольная) получала стерильный физиологический раствор. Другим группам осуществляли введение следующим образом: группа 2 - ^{EGFR}мини-клетки_{PNU-159682}, группа 3 - ^{EGFR}мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетки_{40-мер}, группа 4 - ^{EGFR}мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетки_{50-мер}, группа 5 - ^{EGFR}мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетки.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым векторам доставки на основе мини-клеток для адьювантов на основе нуклеиновых кислот и/или агонистов сенсоров нуклеиновых кислот, и способам их применения. В частности, настоящее изобретение пригодно для усиления полезного иммунного ответа для борьбы с заболеванием у пациента, таким как неопластическое заболевание (например, рак) или инфекция. Например, раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут усиливать противоопухолевую эффективность при введении раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток по отдельности, либо в комбинации с нацеленными биспецифическим лигандом мини-клетками с упакованным цитотоксическим лекарственным средством или миРНК (малой интерферирующей РНК), или микроРНК, одному и тому же пациенту.

Ранее авторы настоящего изобретения обнаружили, что терапевтически значимые концентрации миРНК или микроРНК (длиной приблизительно 23 нуклеотидов) могут быть успешно упакованы в интактные мини-клетки. Это было неожиданно, поскольку эти молекулы имеют большой размер (приблизительно 14000 Да), и не было известно, что такие большие молекулы могут проникать в интактные мини-клетки через двойную наружную мембрану. Кроме того, после упаковки эти миРНК или микроРНК не просачивались и не диффундировали из мини-клеток *in vitro* или *in vivo*.

Авторы настоящего изобретения сделали еще более удивительное открытие, состоящее в том, что гораздо более крупные двухцепочечные олигонуклеотиды длиной 40 и 50 нуклеотидов (40-мерные и 50-мерные) могут быть перенесены в интактные мини-клетки, и эти олигонуклеотиды также могут быть упакованы в терапевтически эффективных концентрациях, которые не диффундируют из мини-клеток. В настоящем описании предоставлено подробное описание этих мини-клеток и способов их применения.

В тексте данного описания ссылки на различные публикации, патенты и опубликованные описания патентов приведены путем отсылок, позволяющих их идентифицировать. Содержания этих публикаций, патентов и опубликованных описаний патентов тем самым включены в настоящее описание посредством ссылки для более полного описания уровня области техники, к которой относится данное изобретение.

1. Терапевтические композиции мини-клеток.

Композиции мини-клеток согласно настоящему изобретению могут применяться для доставки адьювантов на основе нуклеиновых кислот в клетки-мишени млекопитающего, в частности, больного раком человека.

В контексте настоящего изобретения введение раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток, содержащих адьюванты на основе нуклеиновых кислот, для лечения рассматриваемого заболевания (т.е. рака) зависит от нескольких факторов, в соответствии с обычной медицинской практикой. Эти факторы включают, не ограничиваясь перечисленным, возраст пациента, выраженность и развитие заболевания и любую предшествующую или текущую терапию, которую пациент мог получать или получает.

(а) Мини-клетки.

В контексте настоящего документа термин "мини-клетка" относится к производному бактериальной клетки, лишенному хромосом ("бесхромосомному"), и порождаемому в результате нарушения координации во время бинарного деления клеток с сегрегацией ДНК. Мини-клетки отличаются от других малых везикул, таких как так называемые "мембранные пузырьки" (размером приблизительно 0,2 мкм или менее), которые генерируются и высвобождаются спонтанно в определенных ситуациях, но не обусловлены особыми генетическими перестройками или эписомальной экспрессией генов. Равным образом интактные мини-клетки отличаются от бактериальных призраков, которые не генерируются в результате особых генетических перестроек или эписомальной экспрессии генов. Мини-клетки бактериального происхождения, используемые в данном изобретении, полностью интактны и, таким образом, отличаются от других бесхромосомных форм бактериальных клеточных производных, характеризующихся нарушенной, или расщепленной, или даже удаленной наружной или ограничивающей мембраной. См. патент США № 7,183,105, кол. 111, с. 54 и последующие. Интактная мембрана, отличающая мини-клетки согласно настоящему изобретению, позволяет удерживать терапевтический полезный груз (например, адъюванты на основе нуклеиновых кислот или агонисты сенсоров нуклеиновых кислот) внутри мини-клетки до тех пор, пока полезный груз не высвобождается внутри клетки-мишени после поглощения.

Мини-клетки согласно изобретению могут представлять собой безъядерные формы *E.coli* или других бактериальных клеток (например, *S. typhimurium*). Например, в *E.coli* мутация генов *min*, таких как *minCD*, может устранить ингибирование образования перегородки на полюсах клеток во время деления клетки, что приводит к образованию нормальной дочерней клетки и безъядерной мини-клетки. См. de Boer et al. (1992); Raskin & de Boer (1999); Hu & Lutkenhaus (1999); Harry (2001). Для практического применения раскрытых способов в некоторых вариантах реализации желательно, чтобы мини-клетки имели интактные клеточные стенки ("интактные мини-клетки").

Помимо мутаций оперона *min* безъядерные мини-клетки также могут быть получены с использованием ряда других генетических перестроек или мутаций, которые влияют на образование перегородки, например, в *divIB1* в *B. subtilis*. См. Reeve and Cornett (1975); Levin et al. (1992). Мини-клетки также могут быть образованы после нарушения уровней экспрессии генов белков, участвующих в клеточном делении/сегрегации хромосом. Например, сверхэкспрессия *minE* приводит к полярному делению и образованию мини-клеток. Точно так же бесхромосомные мини-клетки могут быть результатом дефектов в хромосомной сегрегации, например, мутации *smc* в *Bacillus subtilis* (Britton et al. (1998)), делеции *spoOJ* в *B. subtilis* (Iretton et al. (1994)), мутации *mukB* в *E.coli* (Hiraga et al. (1989)) и мутации *parC* в *E.coli* (Stewart and D'Ari (1992)). Генные продукты могут поставляться в транс-форме. Например, при сверхэкспрессии из многокопийной плазмиды *CafA* может усиливать скорость деления клеток и/или ингибировать расхождение хромосом после репликации (Okada et al. (1994)), что приводит к образованию цепочечных клеток и безъядерных мини-клеток (Wachi et al. (1989); Okada et al. (1993)).

Соответственно, мини-клетки для применения в настоящем изобретении могут быть получены из любой бактериальной клетки, будь то клетка грамположительной или грамотрицательной бактерии. Кроме того, мини-клетки, применяемые в изобретении, могут иметь интактные клеточные стенки (т.е. представлять собой "интактные мини-клетки"), как отмечено выше, и могут быть отличены от других малых везикул, таких как мембранные пузырьки, которые не обусловлены особыми генетическими перестройками или эписомальной экспрессией генов.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации родительские (исходные) бактерии могут включать одну или более бактерий, выбранных из *Terra-/Glibdacteria* (BV1), *Proteobacteria* (BV2) и BV4, включая *Spirochaetes*, *Sphingobacteria* и *Planctobacteria*. В некоторых вариантах реализации бактерии могут включать одну или более из *Firmicutes* (BV3), таких как *Bacilli*, *Clostridia* или *Tenericutes/Mollicutes*, или *Actinobacteria* (BV5), таких как *Actinomycetales* или *Bifidobacteriales*.

В некоторых вариантах реализации бактерия может включать одну или более из *Eobacteria* (*Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*), *Cyanobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, термофилов (*Aquificae*, *Thermotogae*), альфа-, бета-, гамма- (*Enterobacteriaceae*), дельта- или эpsilon-протеобактерий (*Proteobacteria*), *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Chlorobi/Bacteroidetes*, *Chlamydiae/Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chrysiogenetes*, *Deferribacteres*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Synergistetes*, *Dictyoglomi*, *Lentisphaerae* *Bacillales*, *Bacillaceae*, *Listeriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Lactobacillales*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*, *Clostridiales*, *Halanaerobiales*, *Thermoanaerobacterales*, *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Anaeroplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Haloplasmatales*, *Actinomycineae*, *Actinomycetaceae*, *Corynebacterineae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Frankineae*, *Frankiaceae*, *Micrococcineae*, *Brevibacteriaceae* и *Bifidobacteriaceae*.

Для фармацевтического применения композиция согласно изобретению может содержать мини-клетки, очищенные от иммуногенных компонентов и других токсичных загрязнителей настолько тщательно, насколько это возможно. Методика очистки мини-клеток бактериального происхождения для удаления свободного эндотоксина и родительских бактериальных клеток более подробно описана ниже, а также в публикации WO 2004/113507, полностью включенной в настоящий документ посредством

ссылки.

Еще одним структурным элементом мини-клеток, получаемых из грамотрицательных бактерий, является О-полисахаридный компонент липополисахарида (ЛПС), встроенный во внешнюю мембрану посредством якоря, представляющего собой липид А. Этот компонент представляет собой цепочку повторяющихся звеньев углеводных остатков, содержащую от 70 до 100 повторяющихся звеньев из четырех-пяти сахаров на цепь. Поскольку эти цепи не являются жесткими, в жидкой среде, такой как условия *in vivo*, они могут принимать волнообразную, гибкую структуру.

Как более подробно обсуждается ниже, мини-клетки согласно настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один адъювант на основе нуклеиновой кислоты или плазмиду, кодирующую адъювант на основе нуклеиновой кислоты, доставку которого необходимо осуществить, а также по меньшей мере один агонист сенсоров нуклеиновых кислот. Адъюванты на основе нуклеиновых кислот и агонисты сенсоров нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут связывать родственные рецепторы и вызывать желаемый иммунный ответ (например, интерфероновый иммунный ответ). Как адъюванты на основе нуклеиновых кислот, так и агонисты сенсоров нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению более подробно обсуждаются ниже.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы доставки по меньшей мере одного адъюванта на основе нуклеиновой кислоты или агониста сенсора нуклеиновой кислоты в клетку-мишень, включающие приведение клетки-мишени в контакт с интактной мини-клеткой, содержащей по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, плазмиду, содержащую сегмент, кодирующий по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, или по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты, где клетка-мишень поглощает мини-клетку. После поглощения мини-клетки клеткой-мишенью молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты высвобождается в цитоплазму клетки-мишени или экспрессируется клеткой-мишенью. Мини-клетки могут быть приведены в контакт с клетками-мишенями с помощью биспецифических лигандов, как описано в WO 2005/056749. Контакт между мини-клеткой и клеткой-мишенью может быть осуществлен *in vitro* или *in vivo*.

(b) Адъюванты на основе нуклеиновых кислот.

В контексте настоящего изобретения "адъювант на основе нуклеиновой кислоты" представляет собой нуклеиновую кислоту (т.е. полинуклеотид или олигонуклеотид), которая связывается с и/или активирует сенсор или рецептор нуклеиновой кислоты (т.е. родственный рецептор) в клетке-мишени и вызывает желаемый иммунный ответ. Адъювант на основе нуклеиновой кислоты может содержать ДНК, РНК и/или синтетические нуклеотиды. Кроме того, адъювант на основе нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечным (оц) или двухцепочечным (дц), и он может содержать более сложные конформации нуклеиновых кислот, такие как шпильчатые структуры, триплексы и квадруплексы. Например, в некоторых вариантах реализации раскрытый адъювант на основе нуклеиновой кислоты может представлять собой оцДНК, дцДНК, оцРНК или дцРНК.

Кроме того, адъювант на основе нуклеиновой кислоты согласно изобретению может иметь различную длину. В частности, нуклеиновая кислота может быть очень маленькой, например, представлять собой динуклеотид. Другими словами, адъювант на основе нуклеиновой кислоты может иметь приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24, приблизительно 25, приблизительно 26, приблизительно 27, приблизительно 28, приблизительно 29, приблизительно 30, приблизительно 31, приблизительно 32, приблизительно 33, приблизительно 34, приблизительно 35, приблизительно 36, приблизительно 37, приблизительно 38, приблизительно 39, приблизительно 40, приблизительно 41, приблизительно 42, приблизительно 43, приблизительно 44, приблизительно 45, приблизительно 46, приблизительно 47, приблизительно 48, приблизительно 49, приблизительно 50, приблизительно 51, приблизительно 52, приблизительно 53, приблизительно 54, приблизительно 55, приблизительно 56, приблизительно 57, приблизительно 58, приблизительно 59, или приблизительно 60, или более нуклеотидов в длину.

В качестве альтернативы нуклеиновая кислота в одной интактной мини-клетке может иметь размер более приблизительно 27 нуклеотидов в длину и до приблизительно 4-5 кб. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, присутствующая в бактериальной мини-клетке, может иметь приблизительно 27, приблизительно 28, приблизительно 29, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 75, приблизительно 100, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400, приблизительно 500, приблизительно 600, приблизительно 700, приблизительно 800, приблизительно 900, приблизительно 1000, приблизительно 1500, приблизительно 2000, приблизительно 2500, приблизительно 3000, приблизительно 3500, приблизительно 4000, приблизительно 4500 или приблизительно 5000 нуклеотидов в длину.

В последних успешных исследованиях был идентифицирован ряд нуклеиновых кислот, которые распознаются рецепторами в клетках млекопитающих. Связывание этих нуклеиновых кислот с родственными рецепторами приводит к иницированию выработки интерферонов I и II типа. Эти интерфероны могут выполнять функцию адъювантов, усиливая противоопухолевое действие (обзор приведен в источнике Junt and Barchet, 2015).

Например, сенсоры нуклеиновых кислот семейства толл-подобных рецепторов (TLR) локализованы в эндосомах (Blasius and Beutler, 2010) и избирательно экспрессируются несколькими типами клеток, в основном принадлежащими врожденной иммунной системе (см. фиг. 1). TLR представляют собой трансмембранные белки, состоящие из аминоконцевых лейцин-богатых повторов (LRR) на просветной стороне и цитозольного рецепторного домена Толл/IL-1 (TIR).

В частности, TLR3 активируется двухцепочечной РНК (дцРНК). TLR7 обнаруживает одноцепочечную РНК (оцРНК) и короткую дцРНК. TLR8 связывает короткую оцРНК и продукты распада оцРНК (Tanji et al. (2015)). TLR9, напротив, распознает ДНК, содержащую неметилированные CpG-мотивы, которые обычно присутствуют в бактериальной ДНК (Ohto et al. (2015)).

В TLR7, TLR8 и TLR9 домен TIR иницирует передачу сигналов путем агрегации адаптерного белка MYD88 (белка первичного ответа миелоидной дифференцировки 88). Активация MYD88-зависимого сигнального каскада в конечном итоге приводит к активации ядерного фактора "каппа-би" (NF-κB) и транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины.

Исключительно в плазматоцитодных дендритных клетках (пДК) сигнальный комплекс MYD88 способен вызвать достаточную транскрипцию генов, кодирующих различные подтипы интерферона-α (IFNα), посредством прямой активации регуляторного фактора IFN 7 (IRF7).

TLR3, напротив, передает сигналы через TIR домен-содержащий адаптерный белок, индуцирующий IFNβ (TRIF), который активирует NF-κB, митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK) и передачу сигналов IRF3, и приводит к транскрипции IFNB и провоспалительных цитокинов (Hornung (2014)).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению могут связываться с TLR7, TLR8 и/или TLR9 и активировать их. Адъюванты на основе нуклеиновых кислот могут связываться с этими рецепторами и активировать их в различных типах клеток, включая иммунные клетки и неиммунные клетки. Например, в некоторых вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот могут быть нацелены на иммунные клетки, такие как Т-клетки и/или моноцитарные клетки, которые могут включать, не ограничиваясь перечисленным, моноциты, макрофаги, дендритные клетки (например, пДК, обычные дендритные клетки или миелоидные дендритные клетки).

В некоторых вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению могут связываться с TLR3 и активировать его. В этих вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот также могут быть нацелены на иммунные клетки или неиммунные клетки.

Другой набор сенсоров РНК и ДНК, которые могут быть активированы раскрытыми адъювантами на основе нуклеиновых кислот, широко экспрессируется в цитозоле иммунных и неиммунных клеток (см. фиг. 1). Хеликазы с DExD/H-боксом - ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), и белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), - обнаруживают комплементарные структуры дцРНК. Как RIG-I, так и MDA5 состоят из карбоксиконцевого лиганд-связывающего домена, центрального хеликазного домена с DExD/H-боксом и N-концевого домена активации и рекрутирования каспазы (CARD). Эти CARD задействуют схожие CARD сигнального адаптера митохондриального противовирусного сигнального белка (MAVS) на внешней мембране митохондрий, что приводит к мультимеризации MAVS и активации сигнального комплекса MAVS (Hou et al. (2011)).

RIG-I активируется 5'-трифосфорилированным или 5'-дифосфорилированным концами короткой дцРНК (Hornung et al. (2006); Goubau et al. (2014)). Полагают, что MDA5 связывает дцРНК и разветвленные высокомолекулярные формы РНК (Kato et al. (2008); Pichlmair et al. (2009)).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению могут связываться с RIG-I и/или MDA5 и активировать их. В этих вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот также могут быть нацелены на иммунные клетки или неиммунные клетки.

Еще одним цитозольным сенсором, который может быть активирован раскрытыми адъювантами на основе нуклеиновых кислот, является циклическая ГМФ-АМФ (сGAMP) синтаза (сGAS) (Sun et al. (2013)), рецептор дцДНК. После связывания лиганда сGAS вырабатывает неканонически связанный циклический динуклеотид (CDN) [G(2',5')pA(3',5')p](2'3'-сGAMP), который выполняет функцию вторичного мессенджера для активации стимулятора генов IFN (STING) на эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) (Wu et al. (2013); Gao et al. (2013)).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению могут связываться с сGAS и активировать ее. В этих вариантах реализации адъюванты на основе нуклеиновых кислот также могут быть нацелены на иммунные клетки или неиммунные клетки.

Белок 2, отсутствующий в клетках меланомы (AIM2), представляющий собой еще один цитозольный рецептор дцДНК, который может быть активирован раскрытыми адьювантами на основе нуклеиновых кислот, напротив, инициирует выработку не IFN, а IL-1 β и IL-18.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации адьюванты на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению могут связываться с AIM2 и активировать его. В этих вариантах реализации адьюванты на основе нуклеиновых кислот также могут быть нацелены на иммунные клетки или неиммунные клетки.

В недавних исследованиях было установлено существование клеточных сенсоров ДНК, которые обнаруживают дцДНК в ядре, инициируя иммунную передачу сигналов. Хотя действия этих сенсоров ДНК были изучены преимущественно в цитозоле и эндосомах, появившиеся доказательства сместили центр внимания в сторону ядра.

IFI16 (интерферон-индуцируемый белок 16) представляет собой сенсор ДНК (Dawson and Trapani (1995)), принадлежащий к семейству высокомолекулярных белков HIN-200 (гемопоэтическая экспрессия - индуцируемость интерферонами - ядерная локализация), характеризующихся мотивом из 200 аминокислот, содержащим ДНК-связывающий домен на С-конце и домен PYRIN на N-конце, участвующих главным образом в межбелковых взаимодействиях. IFI16 является первым сенсором вирусной ДНК, для которого было показано действие в ядре, а также в цитоплазме (Dawson and Trapani (1995); Unterholzner et al. (2010)). На внутриклеточную локализацию IFI16 влияют тип клеток, посттрансляционная модификация и обработка клеток.

Например, инвазия патогенов вызывает образование очагов IFI16 в цитоплазме и индуцирует экспрессию гена интерферона β (IFNB) (Unterholzner et al. (2010)), а УФ-излучение вызывает перенос IFI16 из ядра в цитоплазму (Costa et al. (2011)).

Способность IFI16 распознавать ДНК связана с активацией экспрессии интерферона β через взаимодействие со стимулятором генов интерферона (Unterholzner et al. (2010)) и экспрессии интерферона α (Thompson et al. (2014)). Связывание IFI16 с ДНК не зависит от последовательности или содержания АТ (аденина-тимина), но в значительной степени зависит от длины ДНК (Unterholzner et al. (2010)).

Согласно кристаллографическим исследованиям контакт IFI16 HIN-B и двухцепочечной ДНК достигается посредством электростатических взаимодействий между отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом и положительно заряженными белковыми остатками (Jin et al. (2012)). Связывание IFI16 с длинной плазмидной ДНК было изучено, и наблюдалось предпочтение сверхспиральных форм по сравнению с линейными и крестообразной структуры по сравнению с двухцепочечной ДНК (Brazda et al. (2012)).

IFI16 демонстрирует преимущественное связывание с квадруплексной ДНК, что положительно влияет на образование и стабилизацию квадруплексной ДНК (Haronikova et al. (2016)). В неиммунных типах клеток IFI16 преимущественно локализуется в ядре (Diner et al. (2015); Li et al. (2012), (2013); Orzalli et al. (2012)).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации адьюванты на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению могут связываться с IFI16 и активировать его. В этих вариантах реализации адьюванты на основе нуклеиновых кислот также могут быть нацелены на иммунные клетки или неиммунные клетки.

Помимо упомянутых выше, в данной области техники был описан ряд других сенсоров нуклеиновых кислот. Специалисту в данной области техники будет ясно, что любой известный сенсор нуклеиновой кислоты может быть активирован или нацелен с использованием раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток, содержащих адьювант на основе нуклеиновой кислоты, предназначенный для связывания с родственным рецептором (т.е. сенсором нуклеиновой кислоты). Соответственно, сенсоры нуклеиновых кислот, которые могут быть рассмотрены в качестве мишеней или активированы раскрытыми композициями, не имеют конкретных ограничений.

В контексте настоящего изобретения в некоторых вариантах реализации векторы доставки на основе мини-клеток могут содержать по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты. Например, вектор доставки на основе мини-клеток может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 различных адьювантов на основе нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации раскрытый вектор доставки на основе мини-клеток может содержать как по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты, так и по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

(с) Агонисты пути распознавания нуклеиновой кислоты.

В контексте настоящего изобретения "агонист сенсора нуклеиновой кислоты" представляет собой соединение - природное или синтетическое - которое способно оказывать агонистическое действие на известные сенсоры нуклеиновых кислот, включая описанные в предыдущем разделе, но не ограничиваясь ими, и может быть использован для того, чтобы вызвать желаемый иммунный ответ (т.е. интерфероновый ответ).

Например, была изучена функция полинуклеотидных продуктов фермента полинуклеотидфосфорилазы (PNPase 1) как синтетических индукторов активности IFN (Field et al. (1967)). Аналогичным образом было показано, что миметик дцПНК полиинозиновая-полицитидиловая кислота (поли(I:C)) выполняет функцию агониста как для TLR3, так и для MDA5 (Alexopoulou et al. (2001); Gitlin et al. (2006)).

Аналог поли(I:C), поли-ICLC, в состав которого входит поли-L-лизин для повышения устойчивости к РНКазе, в настоящее время рассматривают в качестве многообещающего адьюванта противораковой вакцины (обзор приведен в источнике Ammi et al. (2014)).

Также были разработаны низкомолекулярные агонисты сенсоров нуклеиновых кислот. Например, имиквимод, производное имидазохинолина, является агонистом TLR7 (Hemmi et al. (2002)). Была показана его эффективность при лечении дерматологических новообразований, таких как базальноклеточная карцинома и актинический кератоз. Локальная стимуляция выработки провоспалительных цитокинов, локальное рекрутирование иммунных клеток и улучшенная презентация антигена для индукции ответов Т-хелперов 1 (T_H1) и $CD8^+$ Т-клеток, все из которых являются результатом введения имиквимода, считаются важными условиями для успешного лечения.

Агонисты также могут быть способны связываться с двумя или более сенсорами нуклеиновых кислот. Например, имидазохинолина резиквимод является двойным агонистом TLR7 и TLR8. Таким образом, у людей резиквимод оказывает мощное активирующее действие на дополнительные типы клеток и вызывает выработку более широкого спектра цитокинов. Недостатком может быть то, что это, вероятно, способствует более частому возникновению системных побочных действий, наблюдаемых в клинических исследованиях (Huen and Rook (2014)).

Предпринимаются попытки разработать агонисты человеческого STING, и такие агонисты моделируются на основе физиологического агониста 2'3'-cGAMP, который, как недавно было показано, обладает свойствами адьюванта вакцины (Li et al. (2013)).

В качестве агонистов сенсоров нуклеиновых кислот также могут быть разработаны и использованы синтетические олигонуклеотиды. Например, были разработаны TLR9-стимулирующие синтетические CpG-олигонуклеотиды (CpG-ODN) на основе иммуностимулирующих свойств бактериальной ДНК, которая, в отличие от ДНК человека, богата неметилированными CpG-мотивами (Krieg et al. (1995)). В результате оптимизации характеристик последовательности и модификаций остова были получены подтипы CpG-ODN, преимущественно активирующие либо В-клетки, либо пДК. В настоящее время проводятся многочисленные клинические исследования для определения противоопухолевой активности CpG-ODN в комбинации с химиотерапией или в терапевтических вакцинах.

Комбинированное применение различных агонистов может оказаться более эффективным, так как согласно последним данным совместное вовлечение нескольких рецепторов нуклеиновых кислот вызвало наиболее сильные иммунные ответы в доклинических исследованиях адьювантов вакцин (Goff et al. (2015); Temizoz et al. (2015)).

Таким образом, в некоторых вариантах реализации векторы доставки на основе мини-клеток могут содержать по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты. Например, вектор доставки на основе мини-клеток может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 различных агонистов сенсоров нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации раскрытый вектор доставки на основе мини-клеток может содержать как по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты, так и по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

(d) Нуклеиновые кислоты, кодирующие адьюванты на основе нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты. Например, плазида может кодировать адьювант на основе нуклеиновой кислоты, экспрессируемый внутри клетки-мишени (т.е. клетки млекопитающего или иммунной клетки). Это позволяет осуществлять эндогенную доставку адьювантов на основе нуклеиновых кислот, что для лечения некоторых заболеваний может быть более целесообразным по сравнению с временной природой экзогенной доставки.

Таким образом, интактные мини-клетки бактериального происхождения могут нести плазмидную ДНК, кодирующую один или более адьювантов на основе нуклеиновых кислот, включая, не ограничиваясь перечисленным, двухцепочечную или одноцепочечную РНК или ДНК, способную связываться с TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5, AIM2, cGAS или IFI1, и/или активировать их. С помощью мини-клеток, кодирующих несколько адьювантов на основе нуклеиновых кислот, можно вызвать у пациента устойчивый иммунный ответ. Например, первый адьювант на основе нуклеиновой кислоты может быть экспрессирован из промотора U6, а второй адьювант на основе нуклеиновой кислоты может быть экспрессирован из промотора H1. Эти несколько касет экспрессии могут переноситься одной плазмидой, а также могут переноситься разными плазмидами.

В некоторых вариантах реализации различные адьюванты на основе нуклеиновых кислот могут быть экспрессированы из одного промотора, где рекомбинантная плазида несет каскету экспрессии,

состоящую из нескольких последовательностей адъювантов на основе нуклеиновых кислот, связанных вместе некодирующими полинуклеотидными последовательностями. Один терминатор транскрипции генов может быть расположен ниже по ходу транскрипции от полной кассеты экспрессии.

В некоторых вариантах реализации плазмиды может кодировать смысловые и антисмысловые цепи дцРНК или дцДНК в виде двух независимых транскриптов, которые после экспрессии в клетке-мишени гибридизуются с образованием функционального адъюванта на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации плазмиды кодирует одну или более дцРНК или дцДНК, каждая из которых экспрессируется в виде одного транскрипта, который образует короткую шпильчатую структуру. Шпильчатая структура может быть процессирована другими ферментами в клетке с получением функционального адъюванта на основе нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, подлежащую введению посредством подхода, описанного в этом разделе, также может иметь желаемый кодирующий сегмент, функционально связанный с регуляторным элементом, таким как промотор, терминатор, энхансер и/или сигнальная последовательность. Подходящий промотор может быть тканеспецифическим или даже клеточно-специфическим, в зависимости от терапевтического контекста.

Для целей настоящего изобретения может быть использована сигнальная последовательность для реализации секреции продукта экспрессии или локализации продукта экспрессии в конкретном клеточном компартменте. Таким образом, нуклеиновая кислота (т. е. плазмиды), кодирующая терапевтическую молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, доставляемую посредством интактных мини-клеток, может включать сигнальную последовательность в надлежащей рамке считывания, так что представляющий интерес продукт экспрессии секретруется поглощающей клеткой или ее потомством, тем самым оказывая воздействие на окружающие клетки в соответствии с выбранным подходом к лечению. Примеры сигнальных последовательностей включают С-концевую последовательность секреции гемолизина, описанную в патенте США № 5143830, последовательность секреции BAR1, раскрытую в патенте США № 5037743, и часть сигнальной последовательности полипептида zsig32, описанную в патенте США № 6025197.

(е). Репортерные элементы.

Молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, доставляемые посредством раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток, могут дополнительно содержать репортерный элемент. Репортерный элемент придает своей целевой клетке-хозяину легко обнаруживаемый фенотип или характеристику, обычно путем кодирования полипептида, в других условиях не продуцируемого хозяином, который может быть обнаружен при экспрессии с помощью гистологического анализа или анализа *in situ*, такого как методы визуализации *in vivo*. Например, репортерный элемент, доставляемый интактной мини-клеткой согласно настоящему изобретению, может кодировать белок, производящий в поглощающей клетке-хозяине колориметрическое или флуориметрическое изменение, которое можно обнаружить с помощью анализа *in situ* и которое находится в количественной или полуколичественной зависимости от активации транскрипции. Примерами этих белков являются эстеразы, фосфатазы, протеазы и другие ферменты, активность которых генерирует детектируемый хромофор или флуорофор.

Предпочтительные примеры репортерных элементов включают, не ограничиваясь перечисленным, β-галактозидазу *E. coli*, вызывающую изменение цвета посредством расщепления индигогенного субстрата, индолил-β-D-галактозид и люциферазу, окисляющую длинноцепочечный альдегид (бактериальная люцифераза) или гетероциклическую карбоновую кислоту (люциферин) с сопутствующим испусканием света. Также для применения в этом контексте подходит репортерный элемент, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ) медузы *Aequorea victoria*, как описано Prasher et al. (1995). Примерами из области технологии, связанной с ЗФБ, служат две опубликованные заявки РСТ, WO 95/21191 (раскрывает полинуклеотидную последовательность, кодирующую апопротеин ЗФБ длиной 238 аминокислот, содержащий хромофор, образованный аминокислотами 65-67) и WO 95/21191 (раскрывает модификацию кДНК (комплементарной ДНК) для апопептида ЗФБ *A. victoria*, обеспечивающую получение пептида с измененными флуоресцентными свойствами), а также работа Heim et al. (1994), где сообщается о мутантном ЗФБ, характеризующимся 4-6-кратным увеличением амплитуды возбуждения.

Другие гены, применяемые в качестве репортерного элемента, включают гены, способные трансформировать клетку-мишень вектора доставки на основе мини-клеток с обеспечением экспрессии опознавательных антигенов клеточной поверхности, например белков вирусной оболочки, таких как gp120 (гликопротеин 120) ВИЧ или gD (гликопротеин D) герпеса, которые легко могут быть обнаружены с помощью методов иммунологического анализа.

(f) Упаковка адъювантов на основе нуклеиновых кислот в мини-клетки.

Адъюванты на основе нуклеиновых кислот, которые могут быть кодированы нуклеиновой кислотой, могут быть введены в мини-клетки путем трансформации кодирующей нуклеиновой кислоты в родительскую бактериальную клетку в векторе, таком как плазмиды, кодирующем адъювант на основе нуклеиновой кислоты. При образовании из родительской бактериальной клетки мини-клетка сохраняет оп-

ределенные копии плазмиды и/или продукта экспрессии, адъюванта на основе нуклеиновой кислоты. Более подробные сведения об упаковке продукта экспрессии в мини-клетку содержатся в публикации WO 03/033519, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Адъюванты на основе нуклеиновых кислот также могут быть упакованы в мини-клетки напрямую. Так, адъювант на основе нуклеиновой кислоты может быть упакован в мини-клетки напрямую путем совместной инкубации множества интактных мини-клеток с адъювантом на основе нуклеиновой кислоты в буфере. Состав буфера может различаться в зависимости от условий, хорошо известных в данной области техники, для оптимизации загрузки адъюванта на основе нуклеиновой кислоты в интактные мини-клетки. Буфер также может различаться в зависимости от нуклеотидной последовательности и длины адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, подлежащего загрузке в мини-клетки. После упаковки нуклеиновая кислота остается внутри мини-клетки и защищена от деградации. Длительные исследования инкубации с мини-клетками с упакованной миРНК, инкубированными в стерильном физиологическом растворе, показали, например, отсутствие утечки миРНК.

В некоторых вариантах реализации в одну и ту же мини-клетку может быть упаковано несколько адъювантов на основе нуклеиновых кислот. Такой подход может быть использован для создания у пациента устойчивого иммунного ответа. Например, у больных раком обычно присутствуют опухоли, способные уклоняться от врожденного иммунного ответа. Чтобы бороться с этим уклонением, в мини-клетки могут быть упакованы терапевтически значимые концентрации адъювантов на основе нуклеиновых кислот или агонистов сенсоров нуклеиновых кислот, чтобы обеспечить стимуляцию иммунными клетками (например, Т-клетками, дендритными клетками или моноцитами) иммунной системы к обнаружению и уничтожению раковых клеток. Кроме того, упаковка нескольких адъювантов на основе нуклеиновых кислот или агонистов сенсоров нуклеиновых кислот в одну и ту же мини-клетку может повысить успех терапии, поскольку многие родственные рецепторы принадлежат к различным сигнальным путям и могут вызывать выработку и секрецию различных цитокинов или хемокинов, включая $IFN\alpha$ или $IFN\beta$. Более подробные сведения об упаковке нуклеиновой кислоты в мини-клетку напрямую содержатся в публикации WO 2009/027830, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Низкомолекулярные лекарственные средства, включая агонисты сенсоров нуклеиновых кислот, будь то гидрофильные или гидрофобные, могут быть упакованы в мини-клетки путем создания градиента концентрации лекарственного средства между внеклеточной средой, содержащей мини-клетки, и цитоплазмой мини-клеток. Когда внеклеточная среда содержит более высокую концентрацию лекарственного средства, чем цитоплазма мини-клеток, лекарственное средство естественным образом перемещается по этому градиенту концентрации в цитоплазму мини-клеток. Однако когда направление градиента концентрации меняется, лекарственное средство не перемещается из мини-клеток.

(g) Направление мини-клеток на клетки-мишени.

Для целей настоящего изобретения мини-клетки в составе композиции, как описано выше, направляют на клетку-мишень с помощью лиганда. Клетки-мишени могут включать клетки млекопитающих и, в частности, клетки человека. Клетки-мишени могут представлять собой иммунные клетки или неиммунные клетки, но в предпочтительных вариантах реализации клетки-мишени представляют собой иммунные клетки, такие как Т-клетки, моноциты, дендритные клетки и/или макрофаги.

В некоторых вариантах реализации изобретения лиганд является "биспецифическим". То есть, лиганд проявляет специфичность к клеточным компонентам как мини-клеток, так и клеток-мишеней (например, иммунных клеток), тем самым заставляя данную мини-клетку связываться с клеткой-мишенью, в результате чего последняя поглощает первую. Применение биспецифических лигандов для нацеливания мини-клетки на опухолевую клетку также описано в публикациях WO 05/056749 и WO 05/079854, соответствующее содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Как только такой лиганд прикрепляется к мини-клетке, незанятая специфичность ("моноспецифичность") лиганда сохраняется до тех пор, пока он не вступит во взаимодействие с клеткой-мишенью.

Лиганд может быть экспрессирован внутри мини-клеток или их родительских клеток, а затем экспонируется на поверхности мини-клеток. В качестве альтернативы лиганд может быть прикреплен к клеточной мембране мини-клеток ("нанесен на" нее), например, посредством взаимодействия лиганд-рецептор. В любом случае лиганд не требует специфичности к мини-клетке и проявляет специфичность только к компоненту, характерному для клеток-мишеней. То есть, такой компонент необязательно должен быть уникальным для клеток-мишеней как таковых или даже для конкретного типа иммунных клеток-мишеней при условии, что клетки-мишени демонстрируют компонент на своей клеточной поверхности.

В некоторых вариантах реализации векторы доставки на основе мини-клеток, содержащиеся в вводимой композиции согласно изобретению, могут вступать в контакт с целевым типом клеток и связываться с ними, вызывая их поглощение клетками, на которые затем воздействует терапевтический полезный груз. Этот полезный груз может представлять собой по меньшей мере один адъювант на основе нук-

леиновой кислоты и/или по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

Авторы изобретения обнаружили, что этот подход направленной доставки широко применим к целому ряду клеток-мишеней млекопитающих, включая клетки, которые обычно устойчивы к специфической адгезии и эндоцитозу мини-клеток. Таким образом, тип клетки-мишени не имеет конкретных ограничений. Действительно, за связыванием мини-клетки с клеткой-мишенью следует быстрый эндоцитоз мини-клеток даже нефагоцитарными клетками. Однако в некоторых вариантах реализации клетка-мишень, подходящая для настоящего изобретения, характеризуется экспрессией рецептора на поверхности, который при связывании лиганда облегчает эндоцитоз или макропиноцитоз.

Термин "эндоцитоз" охватывает (1) фагоцитоз и (2) пиноцитоз, где последняя категория сама по себе включает (2а) макропиноцитоз, каждый из которых преимущественно следует по пути поздних эндосом/лизосом. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что взаимодействие между лигандом на мини-клетке и рецептором поверхности клетки млекопитающего активирует определенный путь эндоцитоза, включающий рецептор-опосредованный эндоцитоз (РОЭ), в позднем эндосомальном/лизосомальном компартменте. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что посредством такого пути эндоцитоза мини-клетки способны высвобождать свой полезный груз в цитоплазму клетки-мишени млекопитающего. В случае, когда полезный груз представляет собой кодирующую нуклеиновую кислоту, нуклеиновая кислота не только не полностью разлагается в позднем эндосомальном/лизосомальном компартменте, но также экспрессируется в клетке-мишени млекопитающего.

Лиганды, пригодные для вышеописанного подхода направленной доставки, в соответствии с этим описанием, включают любой агент, связывающийся с компонентом поверхности на клетке-мишени и с компонентом поверхности на мини-клетке. В некоторых вариантах реализации компонент поверхности на клетке-мишени представляет собой рецептор. Лиганды могут содержать полипептидный и/или углеводный компонент. В некоторых вариантах реализации предпочтительными лигандами являются антитела.

Например, антитело, несущее специфичность к компоненту поверхности, такому как маркер иммунной клетки, на клетках-мишенях млекопитающего, может быть эффективно использовано для нацеливания мини-клеток на клетки-мишени для получения иммунного ответа.

В некоторых вариантах предпочтительные лиганды включают антитела и/или производные антител. В контексте настоящего документа термин "антитело" охватывает молекулу иммуноглобулина, полученную путем генерации иммуногенного ответа *in vitro* или *in vivo*. Соответственно, категория "антител" включает моноклональные антитела и гуманизированные антитела, а также производные антител, такие как одноцепочечные фрагменты антител (scFv), биспецифические антитела и т.д. Известно большое количество различных биспецифических белков и лигандов на основе антител, о чем свидетельствует обзорная статья Caravella and Lugovskoy (2010), полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки. Антитела и производные антител, пригодные для использования в настоящем изобретении, также могут быть получены методами рекомбинантных ДНК.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей нацеленные биспецифическим лигандом мини-клетки с упакованным адьювантом на основе нуклеиновой кислоты и/или агонистом рецептора нуклеиновой кислоты, способные доставлять терапевтически значимые концентрации адьюванта на основе нуклеиновой кислоты или агониста рецептора нуклеиновой кислоты в целевые клетки млекопитающего-хозяина, тем самым вызывая у него желаемый полезный иммунный ответ.

2. Способы лечения.

В настоящем документе предложены способы лечения или предупреждения различных заболеваний или состояний с помощью раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток. В некоторых вариантах реализации заболевание, подлежащее лечению или предупреждению, включает опухоль, рак, злокачественное заболевание или пролиферацию раковых клеток. В некоторых вариантах реализации заболевание, подлежащее лечению или предупреждению, представляет собой инфекцию, такую как вирусная инфекция. Более конкретно, изобретение относится к способам активации интерферонового иммунного ответа и, в частности, активации выработки интерферона I типа. Такие способы могут включать введение терапевтически эффективного количества раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток, содержащих по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты и/или по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

Раскрытые способы могут быть использованы для стимулирования распознавания и/или уничтожения иммунной системой инородных тел или патогенных клеток (т.е. вирусов, клеток, инфицированных вирусами, раковых клеток и т.д.) путем введения интактных мини-клеток, содержащих по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты, нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один адьювант на основе нуклеиновой кислоты, или агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации введение раскрытых мини-клеток, содержащих адьювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, не предназначено для непосредственного уничтожения инородного тела или патогенной клетки. Скорее, введение таких мини-клеток предназначено для усиления терапевтической эффективности другого терапевтического агента.

Например, в некоторых вариантах реализации субъекту может быть введена первая доза раскрытых

мини-клеток, содержащих адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, и вторая доза мини-клеток, содержащих другой терапевтический агент (т.е. миРНК или другое биологическое соединение) или лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации вторая доза может содержать цитотоксическое лекарственное средство, такое как химиотерапевтическое средство, и в некоторых вариантах реализации первая и вторая дозы могут быть нацелены на разные типы клеток. Например, мини-клетка для применения в первой дозе, содержащая адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, может быть нацелена на иммунную клетку, в то время как мини-клетка для применения во второй дозе, содержащая химиотерапевтическое лекарственное средство, может быть нацелена на опухолевую клетку. Химиотерапевтические средства и лекарственные средства, которые вводят совместно или вводят до или после введения раскрытых мини-клеток, содержащих адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, могут быть упакованы в другую мини-клетку или нацеленную частицу другого типа, или химиотерапевтические средства или лекарственные средства могут быть введены в неинкапсулированной, свободной форме.

Кроме того, раскрытые мини-клетки, содержащие адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, могут быть введены субъекту, который получает, получал или получит радиационную терапию для лечения рака. Действительно, раскрытые мини-клетки, содержащие адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, могут усиливать эффективность любой известной формы лечения рака путем, например, повышения врожденной противоопухолевой иммунной защиты субъекта.

Действительно, раскрытые способы позволяют вводить олигонуклеотиды, имеющие более приблизительно 27 нуклеотидов в длину и до приблизительно 4-5 кб, в одной интактной мини-клетке. В других вариантах реализации нуклеиновая кислота может быть очень маленькой и иметь размер приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24, приблизительно 25, приблизительно 26, приблизительно 27, приблизительно 28, приблизительно 29, приблизительно 30, приблизительно 31, приблизительно 32, приблизительно 33, приблизительно 34, приблизительно 35, приблизительно 36, приблизительно 37, приблизительно 38, приблизительно 39, приблизительно 40, приблизительно 41, приблизительно 42, приблизительно 43, приблизительно 44, приблизительно 45, приблизительно 46, приблизительно 47, приблизительно 48, приблизительно 49, приблизительно 50, приблизительно 51, приблизительно 52, приблизительно 53, приблизительно 54, приблизительно 55, приблизительно 56, приблизительно 57, приблизительно 58, приблизительно 59, или приблизительно 60, или более нуклеотидов в длину.

Эти олигонуклеотиды могут инициировать иммуномодуляцию в форме выработки интерферона I типа (IFN α и IFN β). Было показано, что выработка интерферона I типа оказывает адъювантное действие и способствует лечению рака и/или инфекций. Таким образом, в некоторых вариантах реализации введение раскрытых мини-клеток, содержащих адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты вместе с другим терапевтическим агентом или лекарственным средством, приведет к более высокой противоопухолевой эффективности, чем введение указанного другого терапевтического агента или лекарственного средства по отдельности.

Раскрытые способы являются существенным улучшением по сравнению с предшествующим уровнем техники, поскольку известно, что непосредственное введение интерферонов I типа затруднительно. Интерфероны имеют короткое время полужизни в кровотоке, и их внутривенное введение обычно приводит к серьезным побочным действиям. Таким образом, раскрытые способы обеспечивают новое средство стимулирования выработки терапевтически эффективного уровня интерферонов физиологически приемлемым способом.

Раскрытые мини-клетки могут быть нацелены непосредственно на конкретные иммунные клетки или они могут быть не нацеленными. В некоторых вариантах реализации не нацеленные интактные мини-клетки подвергаются фагоцитозу в макрофагах или других моноцитарных клетках и тем самым вызывают в этих клетках желаемую иммуномодуляцию.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что раскрытые способы действуют путем активации выработки интерферона I типа, что, в свою очередь, стимулирует иммунные клетки, способные уничтожать раковые клетки или инфицированные клетки. Известно, что иммунная система у больного раком часто подавляется, и раскрытые способы могут обеспечить средство для "пробуждения" иммунной системы больного раком.

Таким образом, когда иммунная система больного раком активна, цитотоксическая терапия первой линии будет более эффективной. Сочетание раскрытых мини-клеток, содержащих адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, с интактными мини-клетками, содержащими цитотоксическое лекарственное средство, обеспечивает превосходную эффективность по срав-

нению с лечением одним лекарственным средством, как показано в примерах 1 и 2.

Как более подробно обсуждается ниже, составы согласно изобретению могут быть введены различными способами и в различные места организма млекопитающего для достижения местного или системного желаемого терапевтического действия (действий). Доставка может быть осуществлена, например, путем перорального введения, путем нанесения состава на полость тела, путем ингаляции или инсуффляции или путем парентерального, внутримышечного, внутривенного, внутрипортального, внутрипеченочного, перитонеального, подкожного, внутриопухолевого или внутрикожного введения. Способ и место введения зависит от локализации клеток-мишеней.

(а) Чистота.

Миниклетки согласно изобретению по существу не содержат контаминирующих родительских бактериальных клеток. Так, содержащие мини-клетки составы согласно изобретению предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^7 мини-клеток, более предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^8 мини-клеток, еще более предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^9 мини-клеток, еще более предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^{10} мини-клеток и наиболее предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^{11} мини-клеток.

Способы очистки мини-клеток известны в данной области техники и описаны в источниках РСТ/IB02/04632, WO 2004/113507 и патенте США № 8591862. Один такой способ сочетает фильтрацию в поперечном потоке (подаваемый поток параллелен поверхности мембраны; Forbes, 1987) и тупиковую фильтрацию (подаваемый поток перпендикулярен поверхности мембраны). Необязательно, комбинированной фильтрации может предшествовать дифференциальное центрифугирование при низкой центробежной силе для удаления некоторой части бактериальных клеток и обогащения тем самым супернатанта мини-клетками.

В еще одном способе очистки используется центрифугирование в градиенте плотности в биологически совместимой среде. После центрифугирования полосу мини-клеток отбирают из градиента и, необязательно, подвергают мини-клетки дополнительным циклам центрифугирования в градиенте плотности для достижения максимальной чистоты. Способ может дополнительно включать предварительную стадию проведения дифференциального центрифугирования содержащего мини-клетки образца. При применении низкой центробежной силы дифференциальное центрифугирование удаляет некоторую часть родительских бактериальных клеток, тем самым обогащая супернатант мини-клетками.

В особенно эффективных способах очистки для повышения чистоты мини-клеток используется бактериальная филаментация. Так, способ очистки мини-клеток может включать стадии (а) воздействия на образец, содержащий мини-клетки, условия, которое заставляет родительские бактериальные клетки принимать нитевидную форму, с последующей (b) фильтрацией образца с получением очищенного препарата мини-клеток.

Известные способы очистки мини-клеток также могут быть объединены. Например, одна высокоэффективная комбинация способов представляет собой следующую.

Стадия А: Дифференциальное центрифугирование культуры бактериальных клеток, продуцирующих мини-клетки. На этой стадии, которая может быть проведена при 2000 g в течение примерно 20 мин, удаляется большинство родительских бактериальных клеток, оставляя мини-клетки в супернатанте.

Стадия В: Центрифугирование в градиенте плотности с использованием изотонической и нетоксичной среды с градиентом плотности. На этой стадии мини-клетки отделяются от многих загрязнений, в том числе родительских бактериальных клеток, с минимальной потерей мини-клеток. Предпочтительно эту стадию способа очистки повторяют.

Стадия С: Фильтрация в поперечном потоке через 0,45 мкм фильтр для дальнейшего снижения содержания контаминирующих родительских бактериальных клеток.

Стадия D: Вызванная стрессом филаментация остаточных родительских бактериальных клеток. Она может быть достигнута путем воздействия на суспензию мини-клеток любого из нескольких стрессогенных условий окружающей среды.

Стадия Е: Обработка антибиотиками для уничтожения родительских бактериальных клеток.

Стадия F: Фильтрация в поперечном потоке для удаления мелких загрязнений, таких как мембранные пузырьки, фрагменты мембран, бактериальный детрит, нуклеиновые кислоты, компоненты среды и т.д., и для концентрирования мини-клеток. Для отделения мини-клеток от мелких загрязнений может быть использован 0,2 мкм фильтр, а для концентрирования мини-клеток может быть использован 0,1 мкм фильтр.

Стадия G: Тупиковая фильтрация для удаления нитевидных мертвых бактериальных клеток. Для проведения этой стадии может быть использован 0,45 мкм фильтр.

Стадия H: Удаление эндотоксина из препарата мини-клеток. Для проведения этой стадии могут быть использованы магнитные шарики, покрытые антителом к липиду А.

В некоторых вариантах реализации процесс очистки обеспечивает удаление (а) мелких пузырьков,

таких как мембранные пузырьки, обычно имеющих размер менее приблизительно 0,2 мкм, (b) свободных эндотоксинов, высвобождаемых из клеточных мембран, и (c) родительских бактерий, живых или мертвых, и их детрита, которые также являются источниками свободных эндотоксинов. Такое удаление может быть осуществлено, среди прочего, с помощью 0,2 мкм фильтра для удаления малых везикул и клеточного детрита, 0,45 мкм фильтра для удаления родительских клеток после стимуляции родительских клеток к образованию нитей, антибиотиков для уничтожения живых бактериальных клеток и антител против свободных эндотоксинов.

В основе раскрытой процедуры очистки лежит открытие авторами настоящего изобретения того, что, несмотря на различие их бактериальных источников, все интактные мини-клетки имеют размер приблизительно 400 нм, т.е. они крупнее, чем мембранные пузырьки и другие малые везикулы, и при этом мельче, чем родительские бактерии. Размер мини-клеток может быть определен с помощью твердотельных методов, таких как электронная микроскопия, или жидкостных методов, например, динамического рассеяния света. Значение размера, полученное каждым из таких методов, может иметь интервал погрешности, и значения могут несколько отличаться в зависимости от используемого метода. Так, размер мини-клеток в высушенном состоянии, измеренный с помощью электронной микроскопии, может составлять приблизительно 400 ± 50 нм. С другой стороны, размер тех же самых мини-клеток, измеренный методом динамического рассеяния света, может составлять приблизительно 500 ± 50 нм. Кроме того, размер нацеленных лигандом мини-клеток с упакованным лекарственным средством, измеренный, опять же, методом динамического рассеяния света, может составлять приблизительно 500 ± 50 нм.

Этот разброс значений размеров легко компенсируется на практике, например, для целей отделения мини-клеток от иммуногенных компонентов и других токсичных загрязнителей, как описано выше. Так, интактная мини-клетка бактериального происхождения характеризуется цитоплазмой, окруженной жесткой мембраной, которая придает мини-клетке жесткую сферическую структуру. Эту структуру можно наблюдать на снимках, полученных с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, на которых измеряют поперечный диаметр мини-клетки между внешними границами жесткой мембраны. В результате этого измерения получают вышеупомянутое значение размера 400 ± 50 нм.

Еще одним структурным элементом мини-клеток, получаемых из грамотрицательных бактерий, является О-полисахаридный компонент липополисахарида (ЛПС), встроенный во внешнюю мембрану посредством якоря, представляющего собой липид А. Этот компонент представляет собой цепочку повторяющихся звеньев углеводных остатков, содержащую от 70 до 100 повторяющихся звеньев из четырех-пяти сахаров на цепь. Поскольку эти цепи не являются жесткими, в жидкой среде, такой как условия *in vivo*, они могут принимать волнообразную, гибкую структуру, придающую им внешний вид морских водорослей в коралловом море; т.е. цепи движутся вместе с жидкостью, оставаясь прикрепленными к мембране мини-клетки.

Под влиянием О-полисахаридного компонента методом динамического рассеяния света можно получить значение размера мини-клеток, составляющее приблизительно 500 нм, как отмечено выше. Тем не менее мини-клетки, полученные из грамотрицательных и грамположительных бактерий, одинаково легко проходят через 0,45 мкм фильтр, что подтверждает эффективный размер мини-клеток, составляющий 400 ± 50 нм. Вышеупомянутый разброс размеров охватывается настоящим изобретением и, в частности, обозначается оговоркой "приблизительно" в выражении "размером примерно 400 нм" и т.п.

Что касается токсичных контаминирующих веществ, композиция согласно изобретению может содержать менее чем приблизительно 350 ЕЭ (единиц эндотоксина) свободного эндотоксина. В этой связи примерами уровней свободного эндотоксина являются приблизительно 250 ЕЭ, приблизительно 200 ЕЭ, приблизительно 150 ЕЭ, приблизительно 100 ЕЭ, приблизительно 90 ЕЭ, приблизительно 80 ЕЭ, приблизительно 70 ЕЭ, приблизительно 60 ЕЭ, приблизительно 50 ЕЭ, приблизительно 40 ЕЭ, приблизительно 30 ЕЭ, приблизительно 20 ЕЭ, приблизительно 15 ЕЭ, приблизительно 10 ЕЭ, приблизительно 9 ЕЭ, приблизительно 8 ЕЭ, приблизительно 7 ЕЭ, приблизительно 6 ЕЭ, приблизительно 5 ЕЭ, приблизительно 4 ЕЭ, приблизительно 3 ЕЭ, приблизительно 2 ЕЭ, приблизительно 1 ЕЭ, приблизительно 0,9 ЕЭ, приблизительно 0,8 ЕЭ, приблизительно 0,7 ЕЭ, приблизительно 0,6 ЕЭ, приблизительно 0,5 ЕЭ, приблизительно 0,4 ЕЭ, приблизительно 0,3 ЕЭ, приблизительно 0,2 ЕЭ, приблизительно 0,1 ЕЭ, приблизительно 0,05 ЕЭ и приблизительно 0,01 ЕЭ соответственно.

Композиция согласно изобретению также может содержать по меньшей мере приблизительно 10^8 мини-клеток, например, по меньшей мере приблизительно 5×10^8 . В качестве альтернативы композиция может содержать порядка приблизительно 10^9 или приблизительно 10^{10} везикул, например, приблизительно 5×10^9 , приблизительно 1×10^{10} или приблизительно 5×10^{10} везикул. Помимо любого такого количества мини-клеток композиция согласно изобретению может, кроме того, содержать менее чем приблизительно 10 контаминирующих живых/родительских бактериальных клеток, например, менее чем приблизительно 9, приблизительно 8, приблизительно 7, приблизительно 6, приблизительно 5, приблизительно 4, приблизительно 3, приблизительно 2 или приблизительно 1 живых/родительских бактериальных клеток.

(b) Составы.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в способах, описанных в настоящем документе, могут включать раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток и фармацевтически приемлемый наполнитель или разбавитель.

В объем изобретения входят композиции или составы, содержащие (а) интактную мини-клетку и (b) фармацевтически приемлемый носитель для нее, причем мини-клетка содержит по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, плазмиду, содержащую сегмент, кодирующий по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты, и/или по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты. По меньшей мере один адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты может включать любой из адъювантов на основе нуклеиновых кислот или агонистов сенсоров нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации состав также может содержать лекарственное средство, как описано в настоящем документе. Предпочтительно мини-клетка, содержащаяся в составе, содержит лекарственное средство. В качестве альтернативы мини-клетка может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плазида, кодирующую лекарственное средство.

Содержащие мини-клетки составы предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^7 мини-клеток, более предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^8 мини-клеток, еще более предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^9 мини-клеток, еще более предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^{10} мини-клеток, и наиболее предпочтительно содержат менее приблизительно одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^{11} мини-клеток.

Составы также необязательно содержат биспецифический лиганд для нацеливания мини-клетки на клетку-мишень. Миниклетка и лиганд могут представлять собой любые из описанных в настоящем документе. Таким образом, в некоторых вариантах реализации мини-клетка содержит по меньшей мере один адъювант на основе нуклеиновой кислоты, нуклеиновую кислоту, кодирующую адъювант на основе нуклеиновой кислоты, и/или по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты, и биспецифический лиганд, способный связываться с компонентом поверхности мини-клетки и компонентом поверхности клетки-мишени млекопитающего.

Состав, содержащий мини-клетки и, необязательно, лекарственные средства и биспецифические лиганды, согласно настоящему изобретению может быть приготовлен обычным способом с использованием одного или более фармацевтически приемлемых наполнителей или эксципиентов.

Составы могут быть представлены в виде единичной дозированной формы, например, в ампулах, или флаконах, или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта или без него. Состав может представлять собой раствор, суспензию или эмульсию в масляных или водных носителях и может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Подходящий раствор является изотоническим кровью реципиента, как, например, физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. В качестве альтернативы составы могут иметь форму лиофилизированного порошка для разведения подходящим носителем, например стерильной, апиrogenной водой или физиологическим раствором. Составы также могут иметь форму депо-препарата. Такие составы пролонгированного действия могут быть введены путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции.

В некоторых вариантах реализации рецептура составов раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток может быть разработана так, чтобы обеспечить возможность введения одновременно с другим терапевтическим агентом или лекарственным средством. В некоторых вариантах реализации рецептура составов раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток может быть разработана так, чтобы обеспечить возможность введения поочередно с другим терапевтическим агентом или лекарственным средством. Например, в некоторых вариантах реализации раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут быть введены до или после получения пациентом химиотерапевтического противоракового лечения. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах реализации раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут быть введены до или после получения пациентом вакцины для предупреждения инфекции.

(c). Режимы введения.

В общем, составы, раскрытые в настоящем документе, могут применяться в соответствующих дозировках, определяемых рутинным тестированием, для достижения оптимального физиологического эффекта при минимизации любой потенциальной токсичности. Режим дозирования может быть выбран в соответствии с различными факторами, включая возраст, массу тела, пол, состояние здоровья пациента; тяжесть состояния, подлежащего лечению, способа введения и функции почек и печени пациента.

Оптимальная точность в достижении концентраций мини-клеток в диапазоне, обеспечивающем максимальную эффективность с минимальными побочными действиями, может потребовать режима,

основанного на кинетике доступности мини-клеток для сайтов-мишеней и клеток-мишеней. Распределение, равновесное состояние и выведение мини-клетки или лекарственного средства могут быть приняты во внимание при определении оптимальной концентрации для режима лечения. Дозировки мини-клеток и лекарственных средств могут быть скорректированы при применении в комбинации для достижения желаемых эффектов.

Кроме того, введение доз составов может быть оптимизировано с использованием системы фармакокинетического/фармакодинамического моделирования. Например, может быть выбран один или более режимов дозирования, а для определения фармакокинетического/фармакодинамического профиля одного или более режимов дозирования может быть использована фармакокинетическая/фармакодинамическая модель. Затем может быть выбран один из режимов дозирования для введения, обеспечивающий достижение желаемого фармакокинетического/фармакодинамического ответа на основе конкретного фармакокинетического/фармакодинамического профиля. См., например, WO 00/67776.

В частности, составы могут быть введены по меньшей мере один раз в неделю в течение нескольких недель. В некоторых вариантах реализации составы вводят по меньшей мере один раз в неделю в течение от нескольких недель до нескольких месяцев. В некоторых вариантах реализации составы вводят по меньшей мере два раза в неделю в течение от нескольких недель до нескольких месяцев. В некоторых вариантах реализации составы вводят по меньшей мере три раза в неделю в течение от нескольких недель до нескольких месяцев. В некоторых вариантах реализации составы вводят по меньшей мере четыре раза в неделю в течение от нескольких недель до нескольких месяцев. В некоторых вариантах реализации составы вводят по меньшей мере пять раз в неделю в течение от нескольких недель до нескольких месяцев. В некоторых вариантах реализации составы вводят по меньшей мере шесть раз в неделю в течение от нескольких недель до нескольких месяцев.

Более конкретно, составы могут быть введены по меньшей мере один раз в сутки в течение приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24, приблизительно 25, приблизительно 26, приблизительно 27, приблизительно 28, приблизительно 29, приблизительно 30 или приблизительно 31 дня.

В качестве альтернативы составы могут быть введены приблизительно один раз в сутки, приблизительно один раз в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, или 31 день, или более.

В качестве альтернативы составы могут быть введены приблизительно один раз в неделю, приблизительно один раз в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 недель, или более.

В качестве альтернативы составы могут быть введены по меньшей мере один раз в неделю в течение приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19, или приблизительно 20 недель, или более.

В качестве альтернативы, составы могут быть введены приблизительно один раз в месяц, примерно один раз в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, или 12 месяцев, или более.

Составы могут быть введены в виде разовой суточной дозы или общая суточная доза может быть введена дробными дозами два, три или четыре раза в сутки.

В способе, где мини-клетки вводят перед введением другого терапевтического агента или лекарственного средства, введение терапевтического агента или лекарственного средства может происходить в любое время от нескольких минут до нескольких часов до или после введения мини-клеток. Другой терапевтический агент или лекарственное средство может, в качестве альтернативы, быть введен(о) в любое время от нескольких часов до нескольких дней, возможно, от нескольких недель до нескольких месяцев до или после введения мини-клеток.

Более конкретно, мини-клетки могут быть введены по меньшей мере приблизительно за 1, приблизительно за 2, приблизительно за 3, приблизительно за 4, приблизительно за 5, приблизительно за 6, приблизительно за 7, приблизительно за 8, приблизительно за 9, приблизительно за 10, приблизительно за 11, приблизительно за 12, приблизительно за 13, приблизительно за 14, приблизительно за 15, приблизительно за 16, приблизительно за 17, приблизительно за 18, приблизительно за 19, приблизительно за 20, приблизительно за 21, приблизительно за 22, приблизительно за 23 или приблизительно за 24 ч до или после введения другого терапевтического агента или лекарственного средства.

Более того, мини-клетки могут быть введены по меньшей мере один раз в сутки приблизительно за 2, приблизительно за 3, приблизительно за 4, приблизительно за 5, приблизительно за 6, приблизительно за 7, приблизительно за 8, приблизительно за 9,

приблизительно за 10, приблизительно за 11, приблизительно за 12, приблизительно за 13, приблизительно за 14, приблизительно за 15, приблизительно за 16, приблизительно за 17, приблизительно за 18, приблизительно за 19, приблизительно за 20, приблизительно за 21, приблизительно за 22, приблизительно за 23, приблизительно за 24, приблизительно за 25, приблизительно за 26, приблизительно за 27, приблизительно за 28, приблизительно за 29, приблизительно за 30 или приблизительно за 31 день до или после введения другого терапевтического агента или лекарственного средства.

В еще одном варианте реализации мини-клетки могут быть введены по меньшей мере приблизительно за 1, приблизительно за 2, приблизительно за 3, приблизительно за 4, приблизительно за 5, приблизительно за 6, приблизительно за 7, приблизительно за 8, приблизительно за 9, приблизительно за 10, приблизительно за 11, приблизительно за 12, приблизительно за 13, приблизительно за 14, приблизительно за 15, приблизительно за 16, приблизительно за 17, приблизительно за 18, приблизительно за 19, или приблизительно за 20 недель, или более до или после введения другого терапевтического агента или лекарственного средства.

В дополнительном варианте реализации мини-клетки могут быть введены по меньшей мере приблизительно за 1, приблизительно за 2, приблизительно за 3, приблизительно за 4, приблизительно за 5, приблизительно за 6, приблизительно за 7, приблизительно за 8, приблизительно за 9, приблизительно за 10, приблизительно за 11 или приблизительно за 12 месяцев до или после введения другого терапевтического агента или лекарственного средства.

Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа, такого как регрессия или ремиссия опухоли). Например, в некоторых вариантах реализации может быть введена разовая болюсная доза векторов доставки на основе мини-клеток, тогда как в некоторых вариантах реализации может быть введено несколько дробных доз в течение определенного периода времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как того требует ситуация. Например, в некоторых вариантах реализации раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут быть введены один или два раза в неделю путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции. В некоторых вариантах реализации раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут быть введены один или два раза в месяц путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции. В некоторых вариантах реализации раскрытые векторы доставки на основе мини-клеток могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в два месяца, один раз в три месяца, один раз в четыре месяца, один раз в пять месяцев или один раз в шесть месяцев.

Конкретные режимы лечения могут быть оценены в зависимости от того, улучшат ли они результат лечения данного пациента, т.е. приведет ли лечение к уменьшению риска рецидива или увеличению вероятности выживания без прогрессирования данного рака или инфекции.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения субъект подвергается лечению, если был получен один или более полезных или желаемых результатов, включая желательные клинические результаты. Например, полезные или желаемые клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, один или более из следующего: уменьшение одного или более симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни пациентов, страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, отсрочка прогрессирования заболевания и/или увеличение выживаемости пациентов.

Кроме того, в то время как субъектом, в отношении которого проводят способы, обычно является пациент с каким-либо видом рака или инфекции, возраст пациента не ограничен. Раскрытые способы пригодны для лечения опухолей, рака, злокачественного заболевания или пролиферации раковых клеток с различными рецидивами и прогностическими исходами во всех возрастных группах и когортах. Раскрытые способы также пригодны для лечения или предупреждения различных инфекций, включая как бактериальные, так и вирусные инфекции, до развития или в течение всего периода инфекции. Кроме того, в некоторых вариантах реализации субъект может представлять собой педиатрического субъекта, тогда как в других вариантах реализации субъект может представлять собой взрослого субъекта.

3. Определения.

Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, обычно понимаемые специалистом в данной области техники, если не определено иное. Для реализации способов, описанных в настоящем документе, могут быть использованы любые подходящие материалы и/или методики, известные специалистам в данной области техники.

Для удобства ниже приведены значения некоторых терминов и фраз, использованных в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Определения других терминов и фраз приводятся на протяжении всего описания.

Формы единственного числа включают в себя формы множественного числа, если из контекста явным образом не следует иное.

В контексте настоящего документа термин "приблизительно" понятен специалистам в данной области техники, и его значение будет варьировать в некоторой степени в зависимости от контекста, в ко-

тором он употребляется. Если некоторые варианты употребления термина не понятны специалистам в данной области техники с учетом контекста, в котором употребляется данный термин, "приблизительно" означает до плюс или минус 10% от конкретного термина.

В контексте настоящего документа подразумевается, что термин "содержащий" означает, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. "По существу состоящий из" при использовании в отношении композиций и способов означает исключение других элементов, имеющих какое-либо существенное значение для композиции или способа. "Состоящий из" для заявленных композиций и существенных стадий способа означает исключение элементов других ингредиентов, содержание которых превышает следовое количество. Варианты реализации, определенные каждым из этих переходных терминов, входят в объем настоящего изобретения. Соответственно, подразумевается, что способы и композиции могут включать дополнительные стадии и компоненты (содержащие) или в качестве альтернативы включать незначимые стадии и композиции (по существу состоящие из), или в качестве альтернативы подразумевать только указанные стадии способа или композиции (состоящие из).

В контексте настоящего документа термин "последовательность" относится ко всей или части полинуклеотидной или полипептидной последовательности.

"Рак", "новообразование", "опухоль", "злокачественное новообразование" и "карцинома", взаимозаменяемо используемые в настоящем документе, относятся к клеткам или тканям, демонстрирующим aberrantный фенотип роста, характеризующийся значительной потерей контроля клеточной пролиферации. Способы и композиции согласно настоящему изобретению особенно применимы к предраковым, злокачественным, предметастатическим, метастатическим и неметастатическим клеткам.

"Комплементарный" относится к топологической совместимости или совпадению взаимодействующих поверхностей двух молекул, такому как спаривание оснований в комплементарных нуклеотидных последовательностях. Таким образом, молекулы могут быть описаны как комплементарные, и, кроме того, характеристики поверхности контакта являются комплементарными друг другу.

"Цитокин" является общим термином для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, действующих на другую популяцию клеток как медиаторы межклеточных взаимодействий.

"Лекарственное средство" относится к любому физиологически или фармакологически активному веществу, которое оказывает местное или системное действие у животных, в частности млекопитающих и людей.

"Экспрессия" в общем относится к процессу, посредством которого полинуклеотидная последовательность претерпевает успешную транскрипцию и трансляцию, так что экспрессируются детектируемые уровни аминокислотной последовательности или белка. В определенном контексте в настоящем документе экспрессия относится к продукции последовательности нуклеиновой кислоты (т. е. адьюванта на основе нуклеиновой кислоты), а не к экспрессии белка или аминокислот. В другом контексте экспрессия относится к продукции белка.

"Клетка-хозяин" относится к клетке, которая может быть или была использована в качестве реципиента для рекомбинантного вектора или другого переноса полинуклеотидов, и включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Потомство отдельной клетки необязательно должно быть полностью идентичным исходной родительской клетке по морфологии или геномной или полному комплементу ДНК вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации.

"Гибридизация" относится к любому процессу, посредством которого полинуклеотидная последовательность связывается с комплементарной последовательностью посредством спаривания оснований.

В контексте настоящего документа выражение "терапевтически эффективное количество" означает, что доза раскрытых частиц в форме шариков обеспечивает специфическое фармакологическое действие, для которого лекарственное средство вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, например, для уменьшения, ослабления или устранения роста, прогрессирования или рецидива рака/опухоли. Следует подчеркнуть, что терапевтически эффективное количество мини-клеток, содержащих адьювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, не всегда будет эффективным для лечения рака/опухолей каждого отдельного субъекта, даже если такая дозировка считается специалистами в данной области техники терапевтически эффективным количеством. Специалисты в данной области техники могут скорректировать то, что считается терапевтически эффективным количеством, в соответствии со стандартной практикой, насколько это необходимо для лечения конкретного субъекта и/или конкретного типа заболевания, т.е. данного рака или инфекции. Терапевтически эффективное количество может различаться в зависимости от способа введения и лекарственной формы, возраста и массы тела субъекта и/или состояния субъекта, включая прогрессирование, стадию и/или класс заболевания на момент лечения.

Термины "лечение" или "лечить" относятся к оказанию желаемого фармакологического и/или физиологического действия на активное заболевание. Например, действие может полностью или частично уменьшать, ослаблять или устранять заболевание, например ингибировать рост и/или прогрессирование рака/опухоли, или вызывать гибель раковых/опухолевых клеток. "Лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности человека, и включает (1) подавление симптома заболевания,

т.е. прекращение его развития; или (2) облегчение симптома заболевания, т.е. обеспечение регрессии заболевания или симптома.

В контексте настоящего документа термины "предупреждать" или "предупреждение" относятся к предупреждению возникновения заболевания или симптома у субъекта, который может быть предрасположен к развитию заболевания или симптома, и/или у которого еще не было диагностировано заболевание или симптом. "Предупреждение" заболевания может включать остановку образования раковых/опухолевых клеток или подавление рецидива роста рака/опухоли, или профилактическое прекращение распространения инфекции у индивидуума.

"Индивидуум", "субъект", "хозяин" и "пациент" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого желательна диагностика, лечение или терапия. В одном из предпочтительных вариантов реализации индивидуум, субъект, хозяин или пациент представляют собой человека. Другие субъекты могут включать, не ограничиваясь перечисленным, крупный рогатый скот, лошадей, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, приматов и мышей.

"Олигонуклеотид" относится к полинуклеотиду, содержащему, например, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 нуклеотидов (нт). Олигонуклеотиды для применения в изобретении предпочтительно состоят из от приблизительно 10 до приблизительно 150 нт. Олигонуклеотид может представлять собой природный олигонуклеотид или синтетический олигонуклеотид. Олигонуклеотиды могут быть модифицированы.

"Мини-клетка" относится к безъядерным формам бактериальных клеток, порожденным нарушением координации во время бинарного деления клеток с сегрегацией ДНК. Мини-клетки отличаются от других малых везикул, которые генерируются и высвобождаются спонтанно в определенных ситуациях, но, в отличие от мини-клеток, не обусловлены особыми генетическими перестройками или эпизомальной экспрессией генов. Для практического применения настоящего изобретения желательно, чтобы мини-клетки имели интактные клеточные стенки ("интактные мини-клетки").

"Модифицированный олигонуклеотид" и "модифицированный полинуклеотид" относятся к олигонуклеотидам или полинуклеотидам с одной или более химическими модификациями естественных молекулярных структур всех или любых оснований, сахарных фрагментов, межнуклеозидных фосфатных связей на молекулярном уровне, а также к молекулам, имеющим добавленные замены, или комбинации модификаций в этих сайтах. Межнуклеозидные фосфатные связи могут представлять собой фосфодиэфирные, фосфотриэфирные, фосфоамидатные, силоксановые, карбонатные, карбоксиметилэфирные, ацетамидатные, карбаматные, тиоэфирные, мостиковые фосфоамидатные, мостиковые метиленфосфонатные, фосфотиоэфирные, метилфосфонатные, фосфодитиоэфирные, мостиковые фосфотиоэфирные или сульфоновые межнуклеотидные связи, или 3'-3', 5'-3' или 5'-5' связи и комбинации таких схожих связей. Фосфодиэфирная связь может быть заменена заменяющей связью, такой как фосфотиоэфирная, метиламино, метилфосфонатная, фосфоамидатная и гуанидиновая, и субъединица рибозы полинуклеотидов также может быть заменена (например, дифосфорный эфир гексозы; пептидо-нуклеиновые кислоты). Модификации могут быть внутренними (однократными или повторяющимися) или находиться на конце(ах) молекулы олигонуклеотида и могут включать добавления к молекуле межнуклеозидных фосфатных связей, такие как модификации дезоксирибозы и фосфата, которые расщепляют или сшиваются с противоположными цепями или со связанными ферментами, или другими белками. Термины "модифицированные олигонуклеотиды" и "модифицированные полинуклеотиды" также включают олигонуклеотиды или полинуклеотиды, содержащие модификации в сахарных фрагментах (например, 3'-замещенные рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотидные мономеры), любые из которых связаны посредством 5'-3' связей.

Фраза "молекулы нуклеиновой кислоты" и термин "полинуклеотиды" обозначают полимерные формы нуклеотидов любой длины, представляющие собой рибонуклеотиды или дезоксинуклеотиды. Они включают одно-, двух- или многоцепочечные ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания. Остов полинуклеотида может содержать сахара и фосфатные группы (которые обычно присутствуют в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахарные или фосфатные группы. В качестве альтернативы остов полинуклеотида может содержать полимер из синтетических субъединиц, таких как амидофосфаты, и, таким образом, может представлять собой олигодезоксинуклеозидный амидофосфат или смешанный амидофосфат-фосфодиэфирный олигомер. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара и связывающие группы, такие как фторрибоза и тиоэфир, и нуклеотидные ветви. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Другие типы модификаций включают эзы, замену одного или более природных нуклеотидов аналогом и введение средств для прикрепления полинуклеотида к белкам, ионам металлов, метящим компонентам, другим полинуклеотидам или твердой подложке.

"Фармацевтически приемлемый" относится к физиологической совместимости. Фармацевтически

приемлемый наполнитель или эксципиент не подавляет биологическую активность вводимой композиции, является химически инертным и нетоксичным для организма, в который его вводят.

"Полипептид" и "белок", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать транслированные, нетранслированные, химически модифицированные, биохимически модифицированные и дериватизированные аминокислоты. Полипептид или белок может быть природным, рекомбинантным или синтетическим, или любой их комбинацией. Кроме того, полипептид или белок может содержать фрагмент природного белка или пептида. Полипептид или белок может представлять собой одну молекулу или может представлять собой многомолекулярный комплекс. Кроме того, такие полипептиды или белки могут иметь модифицированные пептидные остовы. Указанные термины включают слитые белки, включая слитые белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые конструкции с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионина или без них; иммунологически меченые белки; и тому подобное.

"Очищенный" относится к соединению, удаленному из его естественной среды и по меньшей мере приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99%, приблизительно на 99,9% или приблизительно на 99,99% очищенному от других компонентов, с которыми оно связано в естественных условиях.

"Идентичность последовательностей" относится к степени сходства или комплементарности. Может иметь место частичная идентичность или полная идентичность. Частично комплементарная последовательность представляет собой последовательность, которая по меньшей мере частично ингибирует гибридизацию идентичной последовательности с целевым полинуклеотидом; это обозначают функциональным термином "по существу идентичный". Ингибирование гибридизации полностью комплементарной последовательности с целевой последовательностью может быть исследовано с использованием гибридизационного анализа (саузерн- или нозерн-блот, метод гибридизации в растворе и т.п.) в условиях низкой жесткости. По существу идентичная последовательность или зонд будут конкурировать за связывание (т. е. гибридизацию) полностью идентичной последовательности или зонда с целевой последовательностью в условиях низкой жесткости и ингибировать его. Это не означает, что условия низкой жесткости допускают неспецифическое связывание; условия низкой жесткости требуют, чтобы связывание двух последовательностей друг с другом было специфическим (т.е. селективным) взаимодействием. Отсутствие неспецифического связывания может быть проверено с использованием второй целевой последовательности, не имеющей даже частичной степени комплементарности (например, обладающей менее чем приблизительно 30% идентичностью); в отсутствие неспецифического связывания зонд не будет гибридизоваться со второй некомплементарной целевой последовательностью.

Другой способ оценки идентичности последовательностей в контексте двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей связан с обозначением остатков в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании с получением максимального соответствия в определенной области. В контексте настоящего документа термин "процент идентичности последовательностей" означает значение, определенное путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать вставки или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с референсной последовательностью (не содержащей вставок или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают путем определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих положений путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

Композиции и способы согласно изобретению могут подходящим образом применяться на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, отдельно не раскрытых в настоящем документе. Так, например, термины "содержащий", "включающий" и т.д. следует толковать в широком смысле и без ограничения. Кроме того, используемые в настоящем документе термины и выражения были использованы в качестве описательных, а не ограничивающих терминов, и при использовании таких терминов и выражений нет намерения исключать какие-либо эквиваленты продемонстрированных и описанных признаков или их частей, и следует признать, что в объеме заявленного изобретения возможны различные модификации.

Ссылочные документы

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738 (2001).

Ammi, R. et al., Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol. Ther.* 140, 120–131 (2014).

Blasius, A. L. & Beutler, B., Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305–315 (2010).

Brazda V, Coufal J, Liao JC, Arrowsmith CH., Preferential binding of IFI16 protein to cruciform structure and superhelical DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 422, 716–720 (2012).

- Costa S, Borgogna C, Mondini M, De Andrea M, Meroni PL, Berti E, et al., Redistribution of the nuclear protein IFI16 into the cytoplasm of ultraviolet B-exposed keratinocytes as a mechanism of autoantigen processing. *Br J Dermatol.* 164, 282–90 (2011).
- Dawson MJ, Trapani JA., The interferon-inducible autoantigen, IFI 16: localization to the nucleolus and identification of a DNA-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 214, 152–62 (1995).
- Diner, B. A., Li, T., Greco, T. M., Crow, M. S., Fuesler, J. A., Wang, J., and Cristea, I. M., The functional interactome of PYHIN immune regulators reveals IFIX is a sensor of viral DNA. *Mol. Syst. Biol.* 11, 787 (2015).
- Diner, BA., Lum KK., Cristea, IM., The emerging role of nuclear viral DNA sensors. *J. Biol. Chem.* 290, 26412-26421 (2015).
- Field, A. K., Tytell, A. A., Lampson, G. P. & Hilleman, M. R., Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 58, 1004–1010 (1967).
- Gao, P. et al., Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell* 153, 1094–1107 (2013).
- Gitlin, L. et al., Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 8459–8464 (2006).
- Goff, P. H. et al., Synthetic TLR4 and TLR7 ligands as influenza virus vaccine adjuvants induce rapid, sustained and broadly protective responses. *J. Virol.* 89, 3221–3335 (2015).
- Goubau, D. et al., Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 514, 372–375 (2014).
- Haronikova L, Coufal J, Kejnovska I, Jagelska EB, Fojta M et al., IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation. *PLoS One* 11, 1-19 (2016).
- Hemmi, H. et al., Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196–200 (2002).

- Hornung, V. et al., 5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997 (2006).
- Hornung, V., SnapShot: nucleic acid immune sensors, part 1. *Immunity* 41, 868–868.e1 (2014).
- Hou, F. et al., MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146, 448–461 (2011).
- Huen, A. O. & Rook, A. H., Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 26, 237–244 (2014).
- Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, et al., Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity*. 36, 561–571 (2012).
- Junt, T., Barchet, W., Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nat Rev Immunol.* 15, 529-544 (2015).
- Kato, H. et al., Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* 205, 1601–1610 (2008).
- Krieg, A. M. et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546–549 (1995).
- Li, X.-D. et al., Pivotal roles of cGAS–cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* 341, 1390–1394 (2013).
- Li, T., Chen, J., and Cristea, I. M., Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. *Cell Host Microbe* 14, 591–599 (2013).
- Li, T., Diner, B. A., Chen, J., and Cristea, I. M., Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10558–10563 (2012).
- Ohto, U. et al., Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* 520, 702–705 (2015).

- Orzalli, M. H., DeLuca, N. A., and Knipe, D. M., Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E3008–E3017 (2012).
- Pichlmair, A. et al., Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* 83, 10761–10769 (2009).
- Quintieri, L., Geroni, C., Fantin, M., Battaglia, R., Rosato, A., Speed, W., Zanovello, P., Floreani, M., Formation and Antitumor Activity of PNU-159682, A Major Metabolite of Nemorubicin in Human Liver Microsomes. *Clin. Cancer Res.* 11, 1608–1617 (2005).
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J., Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786–791 (2013).
- Tanji, H. et al., Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 109–115 (2015).
- Temizoz, B. et al., TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur. J. Immunol.* 45, 1159–1169 (2015).
- Thompson MR, Sharma S, Atianand M, Jensen SB, Carpenter S, Knipe DM, et al., Interferon gamma inducible protein (IFI) 16 transcriptionally regulates type I interferons and other interferon-stimulated genes and controls the interferon response to both DNA and RNA viruses. *J Biol Chem.* 289, 23568–81 (2014).
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, et al., IFI16 is an innate
- Immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 11, 997–1004 (2010).
- Wu, J. et al., Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826–830 (2013).

Следующие примеры приведены для иллюстрации настоящего изобретения. Следует понимать, что изобретение не должно ограничиваться конкретными условиями или подробностями, описанными в этих примерах.

Примеры

Пример 1. Значительно усиленная регрессия опухоли после лечения ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} и мини-клетками_{40-мер}.

Этот пример демонстрирует, что комбинированное лечение мышинных ксенотрансплантатов нацеленными биспецифическим лигандом интактными мини-клетками с упакованным PNU-159682 вместе с ненацеленными интактными мини-клетками с упакованным 40-мером может повысить противоопухолевую эффективность по сравнению с лечением одними лишь первыми мини-клетками.

Мини-клетки были получены из minCDE-мутантного штамма *S. typhimurium* и очищены с использованием процедуры градиентного центрифугирования/филаментации/фильтрации/удаления эндотоксина, как описано ранее (MacDiarmid et al. (2007)). В очищенные мини-клетки было упаковано химиотерапевтическое лекарственное средство, производное доксорубина PNU-159682 (Quintieri et al. (2005)), или двухцепочечная РНК длиной 40 нуклеотидов (40-мер), как описано (MacDiarmid et al. (2007), (2009)).

Биспецифическое антитело (BsAb), использованное для нацеливания мини-клеток, представляло собой один полипептид, обладающий специфичностью связывания как к О-полисахариду *S. typhimurium* (присутствующему на мини-клетках), так и к EGFR человека (сверхэкспрессируемому на клетках альвеолярной аденокарциномы A549). Специфичность к О-полисахариду была получена из мышинового моноклонального антитела, переменные области для которого были выделены из линии клеток гибридомы 1H10 и представлены в виде одноцепочечного переменного фрагмента (scFv). Специфичность к EGFR, также представленная в виде scFv, была получена из коммерчески доступного антитела

VECTIBIX® (Amgen, США). Два компонента scFv были разделены гибким линкером, и на N-конце введена метка 6xHis для облегчения очистки с помощью металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов и метка с-тус на C-конце для дополнительной помощи в обнаружении. Вектор ДНК, кодирующий BsAb, содержал промотор hCMV для высокого уровня экспрессии и сигнальный пептид для секреции BsAb в среду для культивирования клеток. Вектор экспрессии, кодирующий BsAb, стабильно трансфицировали в адаптированные к суспензионному культивированию клетки яичника китайского хомячка (CHO) в химически определенной среде, не содержащей белка и веществ животного происхождения, и белок экспрессировался в культуре в течение 10 дней.

Для очистки антитела использовали две хроматографические колонки, представлявшие собой металл-аффинную хроматографию с иммобилизованными ионами металлов (колонка IMAC (для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла) - HisTrap Excel) и хроматографию на гидроксипатите (колонка BioRad CHT I (керамический гидроксипатит I типа)), обеспечившие конечную чистоту антитела >98%. Для вирусной безопасности продукта антитело подвергали инаktivации растворителем/детергентом (с использованием TNBP/Tween) и вирусной фильтрации. Конечный выход антитела составил 10 мг из 1 л супернатанта клеточной культуры.

Мыши (самки бестимусных голых мышей возрастом 6 недель), использованные в этом примере, были приобретены у Animal Resources Center, Перт, Западная Австралия, Австралия, и все эксперименты на животных проводили в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных и с одобрения Этического комитета в области исследований на животных. Эксперименты проводили в аккредитованном в Сельскохозяйственном департаменте Нового Южного Уэльса виварии для мелких животных в EnGeneIC Pty Ltd (Сидней, Новый Южный Уэльс, Австралия). Клетки альвеолярной аденокарциномы человека (A549, ATCC) выращивали в тканевой культуре до достижения полной конfluence в колбах T-75 в среде RPMI 1640 с добавками 5% фетальной бычьей сыворотки (GIBCO-BRL Life Technologies, Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния, США) и глутамина (Invitrogen) в увлажненной атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂ при 37°C.

1×10⁶ клеток в 50 мкл бессывороточной среды вместе с 50 мкл матригеля со сниженным содержанием факторов роста (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США) вводили каждой мыши с помощью подкожной инъекции между лопаток, используя иглу 23-го калибра. Опухоли измеряли два раза в неделю, используя электронный цифровой штангенциркуль (Mitutoyo, Япония, точность измерения до 0,001), а средний объем опухоли рассчитывали по формуле: длина (мм) × ширина² (мм) × 0,5 = объем (мм³). Лечение начинали, когда опухоли достигали в среднем ~ 285 мм³, и мышей случайным образом распределяли по четырем различным группам, по 7 мышей на группу. Все введения проводили внутривенно (в/в) в общем объеме 100 мкл. Все дозы мини-клеток содержали 1×10⁹ мини-клеток соответствующего типа.

Схема проведения эксперимента представляла собой следующую. Группа 1 (контрольная) получала стерильный физиологический раствор. Группа 2 ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682}, группа 3 ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками_{40-мер}.

Результаты показали (фиг. 3), что у мышей, получавших лечение ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} (группа 2), была достигнута стабилизация опухоли. Напротив, мыши, получавшие лечение ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками_{40-мер} (группа 3), продемонстрировали очень значительную регрессию опухоли на 44 день после введения в общей сложности 6 доз.

Эти результаты демонстрируют эффективность адьювантов на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению, поскольку терапевтические результаты были значительно лучше при использовании адьюванта по сравнению с лечением безадьювантным лекарственным средством.

Пример 2. Значительно усиленная регрессия опухоли после лечения ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} и мини-клетками_{40-мер} или мини-клетками_{50-мер}.

Этот пример демонстрирует, что комбинированное лечение мышинных ксенотрансплантатов нацеленными биспецифическим лигандом интактными мини-клетками с упакованным PNU-159682 вместе с ненацеленными интактными мини-клетками с упакованным 40-мером или 50-мером может повысить противоопухолевую эффективность по сравнению с лечением одними лишь первыми мини-клетками.

Различные мини-клетки получали, как описано в примере 1. Подготавливали по семь мышей на группу для ксенотрансплантации A549, как описано в примере 1.

Схема проведения эксперимента представляла собой следующую. Группа 1 (контрольная) получала стерильный физиологический раствор. Группа 2 ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682}, группа 3 ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками_{40-мер}, группа 4 ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками_{50-мер}, группа 5 ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками.

Результаты показали (фиг. 4), что у мышей, получавших лечение ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} (группа 2) и ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками (группа 5), была достигнута стабилизация опухоли. Напротив, мыши, получавшие лечение ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками_{40-мер} (группа 3), или ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетками_{50-мер} (группа 4), продемонстрировали значительное увеличение регрессии опухоли на 38 день после введения в общей сложности 6 доз. Также представляет интерес то,

что после развития у мышей, получавших физиологический раствор, опухолей большого объема (~600 мм³) на 36 день и смены лечения на ^{EGFR} мини-клетки_{PNU-159682} + мини-клетки_{40-мер}, объемы опухолей резко уменьшались до ~300 мм³ на 38 день. Это является резким снижением объема опухоли на 50% за 2 дня.

Эти результаты демонстрируют эффективность адъювантов на основе нуклеиновых кислот согласно изобретению, поскольку терапевтические результаты были значительно лучше при использовании адъюванта по сравнению с лечением безадъювантным лекарственным средством.

Пример 3. Возможное лечение человека.

Этот пример иллюстрирует способы с использованием раскрытых векторов доставки на основе мини-клеток для лечения рака.

Пациенту, имеющему или предположительно имеющему рак, вводят терапевтически эффективное количество вектора доставки на основе мини-клеток бактериального происхождения, содержащего по меньшей мере один адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты, путем внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции. Пациента оценивают на наличие и/или серьезность признаков и симптомов, связанных с раком, включая, не ограничиваясь перечисленным, боль, слабость, размер опухоли и т.д., и проводят лечение пациента до уменьшения, ослабления или устранения одного или более признаков/симптомов.

Необязательно, у пациента могут быть взяты образцы для наблюдения за прогрессированием рака после лечения. Необязательно, если признаки/симптомы сохраняются и/или если рак прогрессирует или рецидивирует, вводят еще одну дозу вектора доставки на основе мини-клеток бактериального происхождения, содержащего по меньшей мере один адъювант на основе нуклеиновой кислоты или агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

Специалисту в данной области техники ясно, что настоящее изобретение хорошо адаптировано для выполнения задач и достижения упомянутых, а также присущих ему целей и преимуществ. Специалисту будут понятны его возможные модификации и другие применения. Эти модификации охватываются сущностью изобретения и определены объемом формулы изобретения, в которой изложены неограничивающие варианты реализации изобретения. Все общедоступные документы, цитируемые в настоящем документе, включая, не ограничиваясь перечисленным, опубликованные патентные документы, специальным образом включены посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для доставки молекулы адъюванта на основе нуклеиновой кислоты в клетку-мишень, при этом указанная композиция содержит интактную бактериальную мини-клетку и фармацевтически приемлемый носитель для нее, где указанная мини-клетка содержит:

(i) по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты или по меньшей мере одну плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты;

(ii) по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты, содержащий полинуклеотидный продукт PNase1, поли(I:C), поли-ICLC, имиквимод, имидазохинолин резиквимод или CpG-ODN,

при этом указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты содержит последовательность дцРНК, которая имеет длину от приблизительно 40 нуклеотидов в длину до приблизительно 50 нуклеотидов.

2. Композиция по п.1, где указанная клетка-мишень представляет собой:

(a) клетку млекопитающего; или

(b) клетку человека; или

(c) иммунную клетку человека; или

(d) иммунную клетку человека, представляющую собой моноцитарную клетку, макрофаг, Т-клетку или дендритную клетку.

3. Композиция по п.1 или 2, где:

(a) указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты связывает рецептор на клетке-мишени и/или

(b) указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, связывающуюся по меньшей мере с одним из TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5, AIM2, cGAS или IFI16.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где:

(a) указанная интактная мини-клетка содержит по меньшей мере две молекулы адъюванта на основе нуклеиновой кислоты и/или

(b) указанная интактная мини-клетка содержит указанную молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты и указанный агонист сенсора нуклеиновой кислоты.

5. Композиция по любому из пп.1-4, где:

(a) указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты содержит

последовательность по меньшей мере из 40 нуклеотидов;

(b) указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты представляет собой 40-мер или

(c) указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты представляет собой 50-мер.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где по меньшей мере один агонист сенсора нуклеиновой кислоты включает полинуклеотидный продукт PNPase1.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где:

(a) указанная плазмида содержит регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью, кодирующей по меньшей мере одну молекулу адъюванта на основе нуклеиновой кислоты; и/или

(b) указанная плазмида кодирует множество молекул адъюванта на основе нуклеиновой кислоты.

8. Композиция по любому из пп.1-7, дополнительно включающая биспецифический лиганд, при этом:

(a) указанный биспецифический лиганд содержит первое плечо, несущее специфичность к структуре поверхности мини-клетки, и второе плечо, несущее специфичность к рецептору поверхности нефагоцитарной клетки млекопитающего; или

(b) указанный биспецифический лиганд содержит первое плечо, несущее специфичность к структуре поверхности мини-клетки, и второе плечо, несущее специфичность к рецептору поверхности нефагоцитарной клетки млекопитающего, где структура поверхности мини-клетки представляет собой О-полисахаридный компонент липополисахарида на поверхности мини-клетки; или

(c) указанный биспецифический лиганд содержит первое плечо, несущее специфичность к структуре поверхности мини-клетки, и второе плечо, несущее специфичность к рецептору поверхности нефагоцитарной клетки млекопитающего, где рецептор поверхности клетки млекопитающего способен активировать рецептор-опосредованный эндоцитоз мини-клетки; или

(d) указанный биспецифический лиганд содержит антитело или фрагмент антитела.

9. Композиция по любому из пп.1-8, где клетка-мишень компетентна в отношении фагоцитоза или эндоцитоза.

10. Композиция по любому из пп.1-9, где:

(a) иммунный ответ клетки-мишени включает выработку интерферона I типа и/или

(b) иммунный ответ клетки-мишени включает выработку интерферона I типа, где интерферон I типа включает интерферон- α или интерферон- β .

11. Композиция по любому из пп.1-10, отличающаяся тем, что указанная композиция обеспечивает лечение рака.

12. Композиция по любому из пп.1-10, где указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, которая связывает по меньшей мере один из RIG-I или MDA5, и указанное заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

13. Композиция по любому из пп.1-12, где указанная композиция дополнительно содержит:

(a) лекарственное средство для лечения вирусной инфекции, и при этом указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, которая связывает по меньшей мере один из RIG-I или MDA5; или

(b) химиотерапевтическое средство; или

(c) противовирусное средство, и при этом указанная по меньшей мере одна молекула адъюванта на основе нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, которая связывает по меньшей мере один из RIG-I или MDA5; или

(d) лекарственное средство, где лекарственное средство необязательно упаковано в интактную мини-клетку.

14. Композиция по любому из пп.1-13, где:

(a) указанная композиция содержит менее одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^7 мини-клеток; или

(b) указанная композиция содержит менее одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^8 мини-клеток; или

(c) указанная композиция содержит менее одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^9 мини-клеток; или

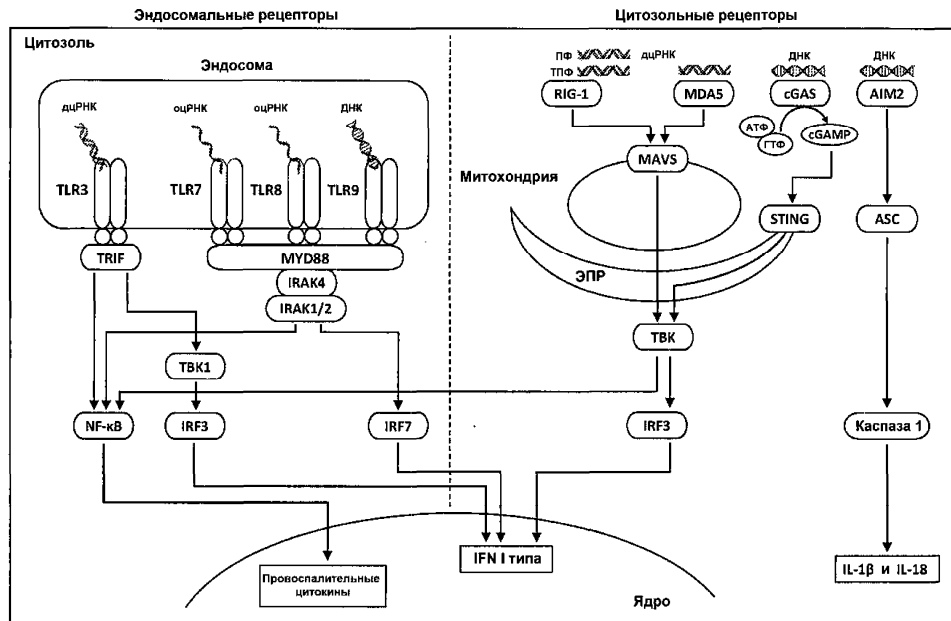
(d) указанная композиция содержит менее одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^{10} мини-клеток; или

(e) указанная композиция содержит менее одной контаминирующей родительской бактериальной клетки на 10^{11} мини-клеток.

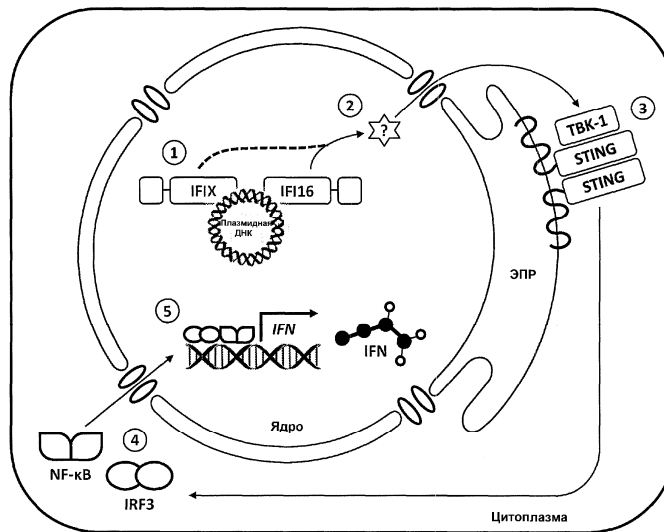
15. Композиция по любому из пп.1-14, где указанная композиция дополнительно содержит вторую интактную бактериальную мини-клетку и фармацевтически приемлемый носитель для нее, где указанная вторая мини-клетка содержит химиотерапевтическое средство.

16. Композиция по п.15, где указанное химиотерапевтическое средство представляет собой

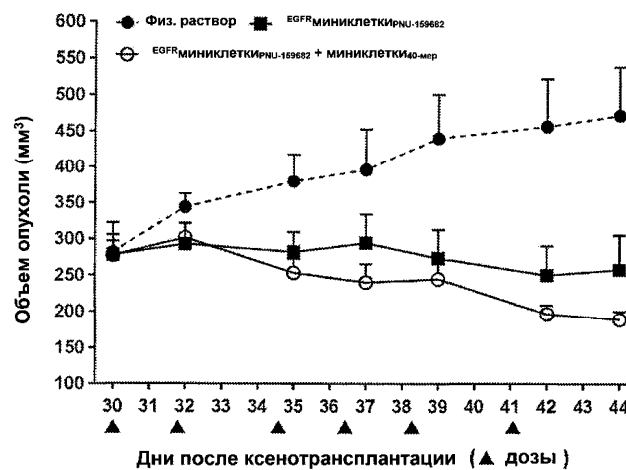
PNU-159682.



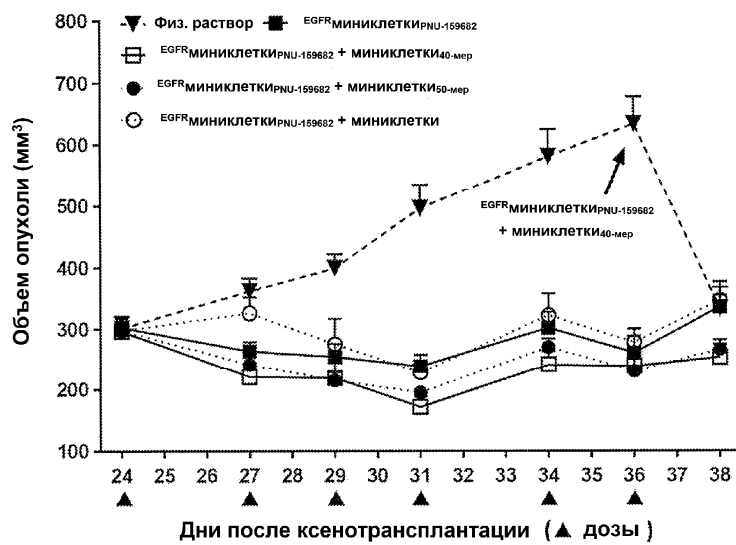
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2