


 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010104618/10, 08.08.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.08.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.08.2007 US 60/964,448

(45) Опубликовано: 10.12.2011 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 03086280 A, 23.10.2003. WO 2007031322
A, 22.03.2007. RU 98100213 A, 27.11.1999. RU
2127125 C1, 10.03.1999. RU 2185818 C1,
27.07.2002. RU 2289410 C2, 20.12.2006. RU
2238279 C2, 20.10.2004. RU 2288921 C2,
10.12.2006.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.03.2010(86) Заявка РСТ:
IB 2008/002104 (08.08.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/022216 (19.02.2009)

Адрес для переписки:

191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ", пат.пов. А.В.Поликарпову

(72) Автор(ы):

ЮРК Марион (DE),
ВОЛЛЬМЕР Йорг Хайнц (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Коули Фармасьютикал ГмбХ (DE)

(54) МОТИВЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РНК В КОНТЕКСТЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ
МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ, ИНДУЦИРУЮЩИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПРОФИЛИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, к иммуностимулирующим полимерам, которые содержат иммуностимулирующие мотивы РНК, а также к способам применения таких полимеров и композиций, содержащих такие

полимеры. Применение описанных иммуностимулирующих полимеров позволяет селективно индуцировать продукцию TLR7-ассоциированного цитокина IFN- α . 4 н. и 1 з.п. ф-лы, 27 ил., 8 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010104618/10, 08.08.2008**

(24) Effective date for property rights:
08.08.2008

Priority:

(30) Priority:
13.08.2007 US 60/964,448

(45) Date of publication: **10.12.2011 Bull. 34**

(85) Commencement of national phase: **15.03.2010**

(86) PCT application:
IB 2008/002104 (08.08.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/022216 (19.02.2009)

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

**JuRK Marion (DE),
VOLL'MER Jorg Khajnts (DE)**

(73) Proprietor(s):

Kouli Farmas'jutikal GmbKh (DE)

(54) **RNA SEQUENCE MOTIVES IN CONTEXT OF CERTAIN INTERNUCLEOTIDE LINKAGES, INDUCING SPECIFIC IMMUNOMODULATING PROFILES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to immunostimulating polymers which contain immunostimulating RNA motives, and also to methods for using such polymers and compositions containing

such polymers.

EFFECT: application of the described immunostimulating polymers allows inducing production of TLR7-associated cytokine IFN- α selectively.

5 cl, 27 dwg, 8 tbl, 7 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке заявлен приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) предварительной заявки на патент США № 60/964448, названной "Sequence Motifs in the Context of Defined Internucleotide Linkages Inducing Specific Immune Modulatory Profiles", поданной 13 августа 2007 года, включенной в данную заявку посредством ссылки.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Toll-подобные рецепторы (TLR) представляют собой семейство высококонсервативных образ-распознающих рецепторных (PRR от англ. pattern recognition receptor) полипептидов, которые распознают ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны (PAMP) и играют критическую роль во врожденном иммунитете у млекопитающих. В настоящее время идентифицировано по меньшей мере десять членов семейства, обозначенных TLR1 - TLR10. Цитоплазматические домены различных TLR характеризуются доменом Toll-интерлейкин-1 рецептора (TIR). Medzhitov R et al. (1998) *Mol Cell* 2:253-8. Распознавание микробной инвазии посредством TLR запускает активацию сигнального каскада, который эволюционно консервативен у *Drosophila* и млекопитающих. Сообщалось о том, что адапторный белок MyD88, содержащий домен TIR, связывается с TLR и привлекает киназу, ассоциированную с рецептором интерлейкина-1 (IRAK), и фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей (TRAF6), к TLR. Предполагают, что MyD88-зависимый сигнальный путь приводит к активации транскрипционных факторов NF-κB и c-Jun NH₂-терминальной киназы (Jnk) митогенактивируемые протеинкиназы (MAPK), представляющие собой критические стадии в иммунной активации и продукции воспалительных цитокинов. Для обзора см. Aderem A et al. (2000) *Nature* 406:782-87, и Akira S et al. (2004) *Nat Rev Immunol* 4:499-511.

Идентифицирован ряд специфических лигандов TLR. Лиганды к TLR2 включают пептидогликан и липопептиды. Yoshimura A et al. (1999) *J Immunol* 163:1-5; Yoshimura A et al. (1999) *J Immunol* 163:1-5; Aliprantis AO et al. (1999) *Science* 285:736-9. Липополисахарид (LPS) представляет собой лиганд для TLR4. Poltorak A et al. (1998) *Science* 282:2085-8; Hoshino K et al. (1999) *J Immunol* 162:3749-52. Бактериальный флагеллин представляет собой лиганд для TLR5. Hayashi F et al. (2001) *Nature* 410:1099-1103. Показано, что пептидогликан является лигандом не только для TLR2, но также и для TLR6. Ozinsky A et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13766-71; Takeuchi O et al. (2001) *Int Immunol* 13:933-40. Недавно сообщили о том, что некоторые низкомолекулярные синтетические соединения - имидазохинолины имиквиномод (R-837) и резиквимод (R-848) представляют собой лиганды для TLR7 и TLR8. Hemmi H et al. (2002) *Nat Immunol* 3:196-200; Jurk M et al. (2002) *Nat Immunol* 3:499.

Начиная с обнаружения того, что неметилованная бактериальная ДНК и ее синтетические аналоги (CpG ДНК) представляют собой лиганды для TLR9 (Hemmi H et al. (2000) *Nature* 408:740-5; Bauer S et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9237-42), сообщалось о том, что лиганды для некоторых TLR включают некоторые молекулы нуклеиновой кислоты. Недавно сообщили о том, что конкретные типы РНК являются иммуностимулирующими зависимым или не зависимым от последовательности образом. Кроме того, сообщалось о том, что эти различные иммуностимулирующие РНК стимулируют TLR3, TLR7 и TLR8.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится в общем к иммуностимулирующим полимерам, которые содержат некоторые мотивы иммуностимулирующей последовательности, а также к родственным иммуностимулирующим композициям, содержащим такие иммуностимулирующие полимеры, и способам применения таких иммуностимулирующих полимеров и композиций. В некоторых аспектах изобретения иммуностимулирующие полимеры представляют собой олигорибонуклеотиды (ORN). Иммуностимулирующие полимеры по изобретению могут быть полезны в любом наборе или применении, которые приводят к стимуляции или усилению иммунного ответа. Как раскрыто ниже, иммуностимулирующие полимеры по изобретению находят

особое применение в изготовлении фармацевтических композиций, включающих адъюванты, вакцины и другие лекарственные средства, для применения в лечении различных состояний, включающих инфекцию, рак, 5 аллергии и астму. Таким образом, изобретение в некоторых аспектах относится к композициям, которые включают иммуностимулирующие полимеры по изобретению, а также способам их применения.

10 Как более подробно раскрыто ниже, иммуностимулирующие полимеры по изобретению характеризуются включением в их состав по меньшей мере одной последовательность-зависимой последовательности иммуностимулирующего 15 мотива. Раскрыто, что последовательность-зависимые последовательности иммуностимулирующего мотива и полимеры, содержащие такие мотивы, являются потенциальными индукторами TLR7-ассоциированного цитокина интерферона-альфа (IFN- α).

20 Один из аспектов изобретения относится к композиции, содержащей одноцепочечный полимер длиной от 4 до 100 звеньев, содержащий rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2 , где полимер не содержит U за пределами мотива rC - rU - rC - rA , где 25 полимер содержит фосфодиэфирный скелет, где по меньшей мере один из N_1 и N_2 не является A_7 , и где rN_1 - rC - rU - rC - rA - rN_2 не является GCUCAA. Композиция в одном из воплощений дополнительно включает носитель для доставки, где 30 носитель для доставки представляет собой липосому, ноисому, липоплекс, полиплекс, липополиплекс, эмульсию воды в масле (W/O) и эмульсию масла в воде (O/W), множественную эмульсию воды-в-масле-в воде (W/O/W), 35 микроэмульсию, наноэмульсию, мицеллу, дендример, виросому, вирусоподобную частицу, полимерную наночастицу (такую как наносфера или нанокапсула), или полимерную микрочастицу (такую как микросфера или микрокапсула), и где композиция не включает липофектин. В одном из 40 воплощений N_1 включает по меньшей мере один A. В другом воплощении N_1 включает по меньшей мере один C. В еще одном воплощении N_1 включает по меньшей мере один G. В еще одном воплощении N_1 включает по меньшей мере один T. В одном из воплощений N_2 включает по меньшей мере один A. В еще 45 одном воплощении N_2 включает по меньшей мере один C. В еще одном воплощении N_2 включает по меньшей мере один G. В еще одном воплощении N_2 включает по меньшей мере один T. 50

Еще один аспект изобретения относится к композиции, содержащей одноцепочечный полимер длиной от 4 до 100 звеньев, содержащий иммуномодулирующий РНК-мотив $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$, где X_2 и X_3 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеотидов, состоящей из C, G и A и их нуклеотидных аналогов, где N_3 и N_4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не включает два мотива A_7 , и где $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C. Композиция в соответствии с еще одним воплощением дополнительно включает носитель для доставки, представляющий собой липосому, ноисому, липоплекс, полиплекс, липополиплекс, эмульсию воды в масле (W/O) и эмульсию масла в воде (O/W), множественную эмульсию воды в масле в воде (W/O/W), микроэмульсию, наноэмульсию, мицеллу, дендример, виросому, вирусоподобную частицу, полимерную наночастицу (такую как наносфера или нанокапсула), или полимерную микрочастицу (такую как микросфера или микрокапсула), и где композиция не включает липофектин. В одном воплощении X_2 представляет собой A. В одном воплощении X_2 представляет собой C. В еще одном воплощении X_2 представляет собой G. В одном из воплощений X_3 представляет собой A. В еще одном воплощении X_3 представляет собой C. В еще одном воплощении X_3 представляет собой G. В одном из воплощений N_3 включает по меньшей мере один A. В еще одном воплощении N_3 включает по меньшей мере один C. Еще в одном воплощении N_3 включает по меньшей мере один G. В еще одном воплощении N_3 включает по меньшей мере один U. В одном из воплощений N_4 включает по меньшей мере один A. В еще одном воплощении N_4 включает по меньшей мере один C. В еще одном воплощении N_4 включает по меньшей мере один G. В еще одном воплощении N_4 включает по меньшей мере один U.

Вышеупомянутые композиции могут содержать дополнительные элементы или модификации полимера. Например, в одном из воплощений композиции дополнительно содержат антиген. В одном из воплощений антиген конъюгирован с полимером. В одном из воплощений мотив $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$

или $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$ содержит модифицированное нуклеоснование, выбранное из группы, состоящей из гипоксантина, инозина, 8-оксоаденина, его 7-замещенных производных, дигидроурацила, псевдоурацила, 2-тиоурацила, 4-тиоурацила, 5-аминоурацила, 5-(C₁-C₆)-алкилурацила, 5-метилурацила, 5-(C₂-C₆)-алкенилурацила, 5-(C₂-C₆)-алкинилурацила, 5-(гидроксиметил)урацила, 5-хлорурацила, 5-фторурацила, 5-бромурцила, 5-гидроксицитозина, 5-(C₁-C₆)-алкилцитозина, 5-метилцитозина, 5-(C₂-C₆)-алкенилцитозина, 5-(C₂-C₆)-алкинилцитозина, 5-хлорцитозина, 5-фторцитозина, 5-бромцитозина, 2-аминопурина, 2-амино-6-хлорпурина, 2,4-диаминопурина, 2,6-диаминопурина, 8-азапурина, замещенного 7-деазапурина, 7-деаза-7-замещенного пурина, 7-деаза-8-замещенного пурина, водорода (остатка без азотистого основания) и любой их комбинации. В еще одном воплощении полимер содержит по меньшей мере одно модифицированное нуклеоснование за пределами мотива $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$ или $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$, где модифицированное нуклеоснование выбрано из группы, состоящей из гипоксантина, инозина, 8-оксоаденина, их 7-замещенных производных, дигидроурацила, псевдоурацила, 2-тиоурацила, 4-тиоурацила, 5-аминоурацила, 5-(C₁-C₆)-алкилурацила, 5-метилурацила, 5-(C₂-C₆)-алкенилурацила, 5-(C₂-C₆)-алкинилурацила, 5-(гидроксиметил)урацила, 5-хлорурацила, 5-фторурацила, 5-бромурцила, 5-гидроксицитозина, 5-(C₁-C₆)-алкилцитозина, 5-метилцитозина, 5-(C₂-C₆)-алкенилцитозина, 5-(C₂-C₆)-алкинилцитозина, 5-хлорцитозина, 5-фторцитозина, 5-бромцитозина, N²-диметилгуанина, 7-деазагуанина, 8-азагуанина, 7-деаза-7-замещенного гуанина, 7-деаза-7-(C₂-C₆)-алкинилгуанина, 7-деаза-8-замещенного гуанина, 8-гидроксигуанина, 6-тиогуанина, 8-оксогуанина, 2-аминопурина, 2-амино-6-хлорпурина, 2,4-диаминопурина, 2,6-диаминопурина, 8-азапурина, замещенного 7-деазапурина, 7-деаза-7-замещенного пурина, 7-деаза-8-замещенного пурина, водорода (остатка без азотистого основания) и любой их комбинации.

В еще одном воплощении полимер дополнительно содержит липофильную группировку, ковалентно связанную с полимером. В одном из воплощений липофильная группировка выбрана из группы, состоящей из холестерила, пальмитила и ацила жирной кислоты. В еще одном воплощении полимер не включает CpG-мотив. В еще одном воплощении полимер не

включает CCGAGCCGAGCUCACC (SEQ ID NO:35). В одном из воплощений полимер имеет длину от 4 до 20 звеньев. В еще одном воплощении полимер имеет длину от 10 до 25 звеньев. В еще одном воплощении полимер имеет
 5 длину от 15 до 19 звеньев. В одном из воплощений каждое звено полимера представляет собой рибонуклеотид. В еще одном воплощении полимерные звенья представляют собой смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.
 10 В еще одном воплощении дезоксирибонуклеотиды включают TCG-мотив на 5'-конце полимера. В еще одном воплощении по меньшей мере одно звено полимера представляет собой аминокислоту. В одном из воплощений полимер связан с агонистом TLR9. В одном из воплощений агонист TLR9 представляет собой небольшую молекулу. В еще одном воплощении полимер связан с агонистом TLR7. В еще одном воплощении полимер связан с агонистом TLR8.

Еще один аспект изобретения относится к способу, включающему
 20 приведение иммунной клетки, способной продуцировать IFN- α (интерферон-альфа), в контакт с одноцепочечным полимером длиной 4-100 звеньев, содержащим иммуностимулирующий РНК-мотив rN_1 -rC-rU-rC-rA-rN₂, где
 25 полимер не содержит U за пределами мотива rC-rU-rC-rA, где полимер содержит фосфодизфирный скелет, где по меньшей мере один из N₁ и N₂ не является A₇, и где rN_1 -rC-rU-rC-rA-rN₂ не является GCUCAA или
 30 UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой A или C, где полимер не приготовлен с липофектином в количестве, эффективном для индукции терапевтически существенной продукции IFN-альфа. В одном из
 35 воплощений полимер содержит по меньшей мере одну стабилизированную связь за пределами иммуностимулирующего мотива. В еще одном воплощении полимер содержит 1-5 стабилизированных связей за пределами иммуностимулирующего мотива. В одном из воплощений
 40 стабилизированная(ые) связь(и) находится/находятся на 5'- и/или 3'-конце.

Еще один аспект изобретения относится к способу, включающему
 45 приведение иммунной клетки, способной продуцировать IFN- α , в контакт с одноцепочечным полимером длиной от 4 до 100 звеньев, содержащим иммуностимулирующий РНК-мотив rN_3 -rX₂-rC-rU-rC-rA-rX₃-rN₄, где X₂ и X₃ независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды,
 50 выбранные из группы нуклеотидов, состоящей из C, G и A и их нуклеотидных

аналогов, где N_3 и N_4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не содержит два мотива A_7 , и где $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$ является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C, где полимер не приготовлен с липофектином в количествах, эффективных для индукции терапевтически существенной продукции IFN-альфа.

В одном из воплощений вышеупомянутые способы не приводят к образованию иммунных клеток, продуцирующих значительные количества фактора некроза опухолей альфа (TNF- α), интерферона-гамма (IFN- γ) или интерлейкина-12 (IL-12) в ответ на введение полимера. В некоторых воплощениях способы осуществляют *in vivo*. В некоторых воплощениях полимер вводят в форме любой из композиций, описанных выше.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения астмы, включающему введение пациенту, страдающему от астмы, эффективного количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$, где полимер не содержит U за пределами мотива $rC-rU-rC-rA$, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет, где по меньшей мере один из N_1 и N_2 не является A_7 , и где $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 не является A или C.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения астмы, включающему введение пациенту, страдающему от астмы, эффективного для лечения астмы количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$, где X_2 и X_3 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеотидов, состоящей из C, G и A и их нуклеотидных аналогов, где N_3 и N_4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не содержит два мотива A_7 , и где $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C.

В одном воплощении любой из вышеописанных способов лечения астмы может дополнительно включать введение пациенту аллергена. В одном из воплощений полимер конъюгирован с аллергеном. В некоторых воплощениях полимер вводят в форме любой из вышеописанных композиций.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения аллергического состояния, включающему введение пациенту, страдающему от аллергического состояния, эффективного для лечения аллергического состояния количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуномодулирующий РНК-мотив rN_1 -rC-rU-rC-rA-rN₂, где полимер не содержит U за пределами мотива rC-rU-rC-rA, где полимер содержит фосфодиэфирный каркас, где по меньшей мере один из N₁ и N₂ не является A₇, и где rN_1 -rC-rU-rC-rA-rN₂ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой A или C.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения аллергического состояния, включающему введение пациенту, страдающему от аллергического состояния, эффективного для лечения аллергического состояния количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив rN_3 -rX₂-rC-rU-rC-rA-rX₃-rN₄, где X₂ и X₃ независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеотидов, состоящей из C, G и A и их нуклеотидных аналогов, где N₃ и N₄ независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не содержит два мотива A₇, и где rN_3 -rX₂-rC-rU-rC-rA-rX₃-rN₄ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой A или C.

В одном воплощении любые вышеописанные способы лечения аллергических состояний могут дополнительно включать введение пациенту аллергена. В одном воплощении полимер конъюгирован с аллергеном. В некоторых воплощениях полимер вводят в форме любой из вышеописанных композиций.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту, страдающему от рака, эффективного для лечения рака количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100

звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$, где полимер не содержит U за пределами мотива $rC-rU-rC-rA$, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет, где по меньшей мере один из N_1 и N_2 не является A_7 , и где $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения рака, включающему введение пациенту, страдающему от рака, эффективного для лечения рака количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$, где X_2 и X_3 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеотидов, состоящей из C, G и A и их нуклеотидных аналогов, где N_3 и N_4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не включает два мотива A_7 , и где $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C.

В одном воплощении любой из вышеописанных способов лечения рака дополнительно включает введение субъекту ракового антигена. В одном из воплощений полимер конъюгирован с антигеном. В других воплощениях способы дополнительно включают введение пациенту второго лекарственного средства для лечения рака. В одном из воплощений лекарственное средство против рака представляет собой одно или более чем одно из карбоплатина, паклитаксела, цисплатина, 5-фторурацила, доксорубина, таксола и гемцитабина. В некоторых воплощениях полимер вводят в форме любой из вышеописанных композиций.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения инфекционного заболевания, включающему введение пациенту, страдающему от инфекционного заболевания, эффективного для лечения инфекционного заболевания количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$, где полимер не содержит U за пределами мотива $rC-rU-rC-rA$, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет, где по меньшей мере один из N_1 и N_2

представляет собой A_7 , и где $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C.

Еще один аспект изобретения относится к способу лечения инфекционного заболевания, включающему введение пациенту, страдающему от инфекционного заболевания, эффективного для лечения инфекционного заболевания количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$, где X_2 и X_3 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеотидов, состоящей из C, G и A и их нуклеотидных аналогов, где N_3 и N_4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не включает два мотива A_7 , и где $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C.

В одном воплощении любые вышеописанные способы лечения инфекционного заболевания могут дополнительно включать введение пациенту микробного антигена.

В одном воплощении полимер конъюгирован с антигеном. В некоторых воплощениях полимер вводят в форме любой из вышеописанных композиций.

Еще один аспект изобретения относится к способу индукции у субъекта Т-хелпер 1 типа (Th1)-подобного иммунного ответа, включающему введение указанному субъекту эффективного количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$, где полимер не содержит U за пределами мотива $rC-rU-rC-rA$, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет, где по меньшей мере один из N_1 и N_2 не является A_7 , и где $rN_1-rC-rU-rC-rA-rN_2$ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X_1 представляет собой A или C.

Еще один аспект изобретения относится к способу индукции Т-хелпер 1 типа (Th1)-подобного иммунного ответа у субъекта, включающему введение указанному субъекту эффективного количества одноцепочечного полимера длиной от 4 до 100 звеньев, содержащего иммуностимулирующий РНК-мотив $rN_3-rX_2-rC-rU-rC-rA-rX_3-rN_4$, где X_2 и X_3 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеотидов,

состоящей из С, G и A и их нуклеотидных аналогов, где N₃ и N₄ независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный каркас и не включает два мотива A₇, и где
 5 rN₃-rX₂-rC-rU-rC-rA-rX₃-rN₄ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой A или C.

В еще одном воплощении любой из вышеописанных способов активации Th1-подобного иммунного ответа может дополнительно включать введение
 10 пациенту антигена. В одном из воплощений полимер конъюгирован с антигеном. В некоторых воплощениях полимер вводят в форме любой из вышеописанных композиций.

Изобретение не ограничено его применением в отношении подробной информации о конструкции и расположении компонентов, изложенных в
 20 следующем описании или проиллюстрированных в графических материалах. Изобретение может быть представлено другими воплощениями и практически применено или осуществлено различными путями. Кроме того, используемые в данной заявке обороты и терминология приведены для описания и не должны
 25 рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Предполагается, что “включающий,” “содержащий” или “имеющий,” “содержащий,” “охватывающий” и различные их варианты охватывают сущности, перечисленные ниже, и их эквиваленты, а также дополнительные сущности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлен график, демонстрирующий продукцию IFN-α в
 35 мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) после приведения клеток в контакт с олигорибонуклеотидами (ORN). ORN (начальная концентрация: 2 мкМ + 50 мкг/мл DOTAP (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмонийметилсульфат)) инкубировали с человеческими PBMC,
 40 и супернатанты исследовали через 24 ч в отношении IFN-α с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Показаны положительный контроль (CCGUCUGUUGUGUGACUC; SEQ ID NO:1) и четыре тестируемые
 45 последовательности (SEQ ID NO:2-5, см. Таблицу 1). Представлено среднее значение ± SEM (стандартная ошибка среднего) для 3 доноров. На оси y показана концентрация IFN-α в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 2 представлены два графика, демонстрирующие индукцию IFN- α (Фиг. 2A) и IL-12p40 (Фиг. 2B) с помощью ORN. Показаны ORN, о которых известно, что они индуцируют и TLR 7/8-ассоциированные цитокины (SEQ ID NO:1), и ORN, которые индуцируют больше TLR7-ассоциированных цитокинов (SEQ ID NO:3), чем TLR8-ассоциированных цитокинов. Человеческие PBMC инкубировали с ORN в присутствии DOTAP (2 мкМ ORN и 50 мкг/мл DOTAP), и супернатанты исследовали с помощью ELISA через 24 ч на IFN- α и IL-12p40. Представлено среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров. Оси y представляют собой концентрации IFN- α (Фиг. 2A) и IL-12p40 (Фиг. 2B) в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 3 представлен график, демонстрирующий индукцию продукции IFN- α в человеческих PBMC после контакта клеток с олигорибонуклеотидами (ORN). ORN (начальная концентрация: 2 мкМ + 25 мкг/мл DOTAP) инкубировали с человеческими PBMC, и супернатанты исследовали через 24 часа на IFN- α с помощью ELISA. Показаны SEQ ID NO:3 и четыре ORN с незначительными вариациями последовательности (SEQ ID NO:6, 7, 11 и 12, см. Таблицу 2). Показано среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров. На оси y показана концентрация IFN- α в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 4 представлены два графика, демонстрирующие индукцию IFN- α (Фиг. 4A) и IL-12p40 (Фиг. 4B) с помощью ORN. Показаны SEQ ID NO:3 и три других ORN с незначительными вариациями последовательности (SEQ ID NO:8-10, см. Таблицу 3). Человеческие PBMC инкубировали с ORN в присутствии DOTAP (2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP), и супернатанты исследовали на IFN- α и IL-12p40 через 24 часа с помощью ELISA. Представлено среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров. На осях y показаны концентрации IFN- α (Фиг. 4A) и IL-12p40 (Фиг. 4B) в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 5 представлены два графика, показывающие индукцию IFN- α (Фиг. 5A) и IL-12p40 (Фиг. 5B) с помощью ORN. Показаны SEQ ID NO:3 и три других ORN с незначительными вариациями последовательности (SEQ ID NO:13-15, см. Таблицу 4). Человеческие PBMC инкубировали с ORN в присутствии DOTAP (2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP), а супернатанты исследовали на IFN- α и IL-12p40 через 24 часа с помощью ELISA.

Представлено среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров. На осях у показаны концентрации IFN- α (Фиг. 5A) и IL-12p40 (Фиг. 5B) в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 6 представлены два графика, показывающие индукцию IFN- α (Фиг. 6A) и IL-12p40 (Фиг. 6B) с помощью ORN. Показаны SEQ ID NO:3 и три других ORN с незначительными вариациями последовательности (SEQ ID NO:19-21, см. Таблицу 5). Человеческие PBMC инкубировали с ORN в присутствии DOTAP (2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP), а супернатанты исследовали на IFN- α и IL-12p40 через 24 часа с помощью ELISA. Представлено среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров. На осях у показаны концентрации IFN- α (Фиг. 6A) и IL-12p40 (Фиг. 6B) в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 7 представлены четыре графика, показывающие индукцию IFN- α (Фиг. 7A и 7C) и IL-12p40 (Фиг. 7B и 7D) с помощью ORN. Показаны SEQ ID NO:3 и шесть других ORN с незначительными вариациями последовательности (SEQ ID NO:16-18 и 22-24, см. Таблицу 3). Человеческие PBMC инкубировали с ORN в присутствии DOTAP (2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP), и супернатанты исследовали на IFN- α и IL-12p40 через 24 часа с помощью ELISA. Показано среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров. На осях у показаны концентрации IFN- α (Фиг. 7A и 7B) и IL-12p40 (Фиг. 7C и 7C) в пг/мл, а на оси x показан log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 8 представлены четыре графика, сравнивающие индукцию цитокина *in vitro* с помощью ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (GACACACACACUCACACACACACA; SEQ ID NO:27). SEQ ID NO:27 не вызывает значительной индукции IL-12 (Фиг. 8A), IL-6 (Фиг. 8B), IL-2R (Фиг. 8C) или IL-7 (Фиг. 8D). Результаты сравнивали с отрицательным контролем (GACACACACACACACACACACACA; SEQ ID NO:25), не содержащим UCA ORN с U-богатым 3'-концом (GACACACACACACACACACACUUU; SEQ ID NO:26), и положительным контролем (UUGUUGUUGUUGUUGUUGUU (все фосфотионаты); SEQ ID NO:28). Человеческие PBMC от трех здоровых доноров крови инкубировали в течение 24 часов с концентрациями ORN вплоть до 2 мкМ в присутствии DOTAP. Супернатанты собирали и измеряли концентрацию хемокинов или цитокинов с помощью ELISA. Оси у представляют собой

концентрацию цитокина или хемокина в пг/мл, а на осях x показан log концентрации ORN в мкМ.

5 На Фиг. 9 представлены четыре графика, сравнивающие индукцию цитокина *in vitro* с помощью ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (SEQ ID NO:27). SEQ ID NO:27 не индуцирует существенного IL-10 (Фиг. 9A), IL-15 (Фиг. 9B), IL-12p40 (Фиг. 9C) или TNF- α (Фиг. 9D). Результаты сравнивают с отрицательным контролем (SEQ ID NO:25), не содержащим UCA ORN с U-богатым 3'-концом (SEQ ID NO:26), и положительным контролем (SEQ ID NO:28). Человеческие PBMC от трех здоровых доноров крови инкубировали в течение 24 часов с вплоть до 2 мкМ ORN в присутствии DOTAP. Супернатанты собирали и концентрацию цитокина или хемокина измеряли с помощью ELISA. Оси y представляют собой концентрации цитокина или хемокина в пг/мл, а оси x демонстрируют log концентрации ORN в мкМ.

20 На Фиг. 10 представлены четыре графика, сравнивающие индукцию цитокина *in vitro* с помощью ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (SEQ ID NO:27). SEQ ID NO:27 не вызывает существенного накопления MIP-1 α (Фиг. 10B), IFN- γ (Фиг. 10C) или MIP-1 β (Фиг. 10D), но вызывает образование IFN- α (Фиг. 10A). Результаты сравнивают с отрицательным контролем (SEQ ID NO:25), не содержащим UCA ORN с U-богатым 3'-концом (SEQ ID NO:26) и положительным контролем (SEQ ID NO:28). Человеческие PBMC от трех здоровых доноров крови инкубировали в течение 24 часов с концентрацией ORN до 2 мкМ в присутствии DOTAP. Супернатанты собирали и концентрации цитокинов и хемокинов измеряли с помощью ELISA. Оси y представляют собой концентрации цитокина или хемокина в пг/мл, а оси x демонстрируют log концентрации ORN в мкМ.

40 На Фиг. 11 представлены три графика, сравнивающие индукцию цитокина *in vitro* с помощью ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (SEQ ID NO:27). SEQ ID NO:27 не индуцирует значительных количеств MIG (Фиг. 11C), но индуцирует IP-10 (Фиг. 11A) и MCP-1 (Фиг. 11B). Результаты сравнивают с отрицательным контролем (SEQ ID NO:25), не содержащим UCA ORN с U-богатым 3'-концом (SEQ ID NO:26), и положительным контролем (SEQ ID NO:28). Человеческие PBMC от трех здоровых доноров крови инкубировали в течение 24 часов с концентрацией ORN до 2 мкМ ORN в присутствии DOTAP.

Супернатанты собирали и концентрации цитокинов и хемокинов измеряли с помощью ELISA. Оси у представляют собой концентрации цитокина или хемокина в пг/мл и оси х демонстрируют log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 12 представлены четыре графика, сравнивающие индукцию цитокина *in vivo* при помощи ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (SEQ ID NO:3). SEQ ID NO:3 индуцировал IFN- α (Фиг. 12A и C) и IP-10 (Фиг. 12B и D) через 3 часа и 24 часа. Активность SEQ ID NO:3 сравнивали с активностью двух ORN (GACACACACACACACACACAUU; SEQ ID NO:30; и UUAUUUAUUUAUUUAUUUAUU (фосфоротиоатный скелет); SEQ ID NO:33), которые индуцируют TLR7- и TLR8-ассоциированные цитокины и два ORN (UUGUUGUUGUUGUUGUUGUU; SEQ ID NO:31; и UUAUUUAUUUAUUUAUUUAUU (фосфодиэфирный скелет); SEQ ID NO:32), которые индуцируют в основном TLR8-ассоциированные цитокины. Оси х демонстрируют используемые ORN (включающие физиологический раствор и DOTAP в качестве отрицательных контролей) и оси у демонстрируют концентрацию цитокинов в пг/мл. HBS, забуференный физиологический раствор.

На Фиг. 13 представлены пять графиков, сравнивающие индукцию цитокинов *in vivo* при помощи ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (SEQ ID NO:3). SEQ ID NO:3 не индуцирует значительные количества NF- α , IL-2, IL-12, IL-6 или IL-10 (Фиг. 13A-E, соответственно) в момент времени 3 часа. Активность SEQ ID NO:3 сравнивали с активностью двух ORN, которые индуцируют TLR7- и TLR8-ассоциированные цитокины (SEQ ID NO:30 и 33) и двух ORN, которые индуцируют в основном TLR8-ассоциированные цитокины (SEQ ID NO:31 и 32). Оси х демонстрируют используемые ORN (включающие физиологический раствор и DOTAP в качестве отрицательных контролей) и оси у демонстрируют концентрацию цитокина в пг/мл. HBS, забуференный физиологический раствор.

На Фиг. 14 представлены четыре столбиковые диаграммы, демонстрирующие активацию *in vivo* клеток селезенки при помощи ORN с иммуностимулирующим UCA-мотивом (SEQ ID NO:3). Активированные SEQ ID NO:3 CD3⁺ Т-клетки селезенки (Фиг. 14A и B) и DX5⁺ В-клетки (Фиг. 14C и D). Клетки выделяли из образцов селезенки и разделяли посредством FACS (клеточный сортер с возбуждением флуоресценции) анализа. Оси х

демонстрируют используемые ORN (включающие физиологический раствор и DOTAP в качестве отрицательных контролей) и оси у демонстрируют % CD69⁺ клеток (А и С) или IL-12R⁺ клеток (В и D). HBS, забуференный физиологический раствор.

На Фиг. 15 представлен график, демонстрирующий индукцию IFN- α указанными ORN, включающими SEQ ID NO:27 с одним U в UCA-мотиве по сравнению с другими ORN с U в количестве до трех, но без UCA-мотива. Ось у представляет собой концентрацию IFN- α в пг/мл, а ось x демонстрирует log концентрации ORN в мкМ.

На Фиг. 16 представлены четыре столбиковые диаграммы, изображающие индукцию IFN- α , IP-10, IL-12 и IL-6 у TLR9-нокаутированных (TLR9 KO), TLR7-нокаутированных (TLR7 KO) и контрольных мышей C57BL/6 в ответ на указанные ORN или CpG ODN 1826 (SEQ ID NO:34). HBS, забуференный физиологический раствор.

На Фиг. 17 представлена пара столбиковых диаграмм, изображающих индукцию IFN- α и IP-10 у MyD88-нокаутированных (MyD88 KO) и контрольных мышей C57BL/6. HBS, забуференный физиологический раствор.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Описаны иммуностимулирующие олигорибонуклеотиды (ORN), которые, по-видимому, стимулируют иммунную систему человека TLR7- и/или TLR8-зависимым образом. Например, ORN, содержащие GU-богатые и CU-богатые мотивы, утратившие поли-G концы, по-видимому, действуют на TLR7 и TLR8. ORN с AU-богатыми мотивами, утратившими поли-G концы, по-видимому, действуют только на TLR8. ORN, содержащие иммуностимулирующий РНК-мотив, фланкированный поли-G мотивом(ами), по-видимому, стимулируют иммунный ответ через TLR7, а не через TLR8. Это приводит к образованию высоких количеств IFN- α в присутствии катионных липосомальных препаратов, таких как, например, DOTAP. Этот эффект, вероятно, опосредован TLR7, поскольку IFN- α -продуцирующие плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) экспрессируют TLR7, а не TLR8. Наблюдаемая стимуляция других цитокинов, например TNF- α , IL-12 и IFN- γ , по-видимому, опосредована TLR8. Например, наиболее вероятно, что активация моноцитов представляет собой прямой TLR8-опосредованный эффект, поскольку показано, что моноциты

экспрессируют TLR8, но не TLR7, и секретируют TNF- α после стимуляции ssRNA (одноцепочечной РНК). Недавно были идентифицированы ORN с различными иммунными профилями и обладающие определенным мотивом для активации РНК-опосредованных ответов. Некоторые из этих ORN не индуцируют продукцию IFN- α человеческими PBMC, но индуцируют продукцию значительных количеств TNF- α , IL-12 и IFN- γ , что свидетельствует о стимуляции TLR8, но не TLR7.

Настоящее изобретение включает обнаружение класса полимеров, содержащих специфические РНК-мотивы, которые могут индуцировать РНК-опосредованные иммунные ответы, называемые TLR7-опосредованными (такие как продукция IFN- α в pDC), без индукции значительных количеств TLR8-опосредованной (т.е. продукция цитокинов, которые продуцируются TLR8-экспрессирующими клетками, таких как TNF- α из моноцитов) иммунной активации. Используемый в данной заявке термин “значительное количество” означает количество, которое отличается от количеств, продуцируемых другими иммуностимулирующими ORN. “Без индукции значительных количеств TLR8-опосредованной иммунной активации” относится к такой иммунной активации, при которой индуцированные уровни факторов, связанных с TLR-активацией, минимальны по сравнению с уровнями, индуцированными такими ORN, которые содержат GU-богатые и CU-богатые мотивы, не содержащие поли-G концов, упомянутых выше, или другими ORN, которые, по-видимому, стимулируют TLR8. Таким образом, ORN по настоящему изобретению индуцируют меньше цитокинов, типичных для РНК-лиганда TLR8 или TLR7/8, например провоспалительных цитокинов TNF-альфа, IL-6. В некоторых воплощениях существенное количество представляет собой “значительное количество”. Полимеры описанного в данной заявке класса являются одноцепочечными, имеют фосфодиэфирный скелет и обладают иммуностимулирующим РНК-мотивом, содержащим последовательность CUCA.

Этот класс ассоциирован с иммунным профилем, который характерен для наиболее эксклюзивной активации TLR7-подобного иммунного ответа. Например, как показано на Фиг. 4, полимер по изобретению, SEQ ID NO:3, индуцирует очень большие количества IFN- α при приготовлении с DOTAP без

значительной индукции IL-12p40. Наоборот, полимеры со сходной последовательностью, но утратившие иммуностимулирующий мотив CUCA, SEQ ID NO 8-10, индуцировали большие количества IL-12p40.

Новый иммуностимулирующий мотив, который был обнаружен, является иммуностимулирующим только в контексте фосфодиэфирного скелета. Интересно, что иммуностимулирующие полимеры по изобретению, которые содержат этот мотив, как было обнаружено, индуцируют сильный IFN- α ответ, но не стимулируют другие типичные цитокины, например те, которые индуцируются в ответ на TLR8 стимуляцию. Таким образом, аспект изобретения относится к иммуностимулирующему полимеру, содержащему иммуностимулирующий мотив, который индуцирует в основном TLR7-ассоциированные цитокины и имеет фосфодиэфирный скелет.

В одном из аспектов изобретения иммуностимулирующий РНК-мотив представляет собой rN_1 -rC-rU-rC-rA-rN₂, где полимер не содержит U за пределами мотива rC-rU-rC-rA, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет, где по меньшей мере один из N₁ и N₂ не является A₇ (rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA), и где rN_1 -rC-rU-rC-rA-rN₂ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой A или C. В некоторых воплощениях N₁ включает по меньшей мере один A, один C или один G. В других воплощениях N₁ включает по меньшей мере один T, например, в химере РНК:ДНК. В некоторых воплощениях N₂ включает по меньшей мере один A, один C, один G или один T.

В еще одном аспекте изобретения иммуностимулирующий РНК-мотив представляет собой rN_3 -rX₂-rC-rU-rC-rA-rX₃-rN₄, где X₂ и X₃ отсутствуют или представляют собой нуклеотиды, выбранные из группы нуклеозидов и нуклеозидных аналогов, состоящих из C, G и A, где N₃ и N₄ отсутствуют или представляют собой один или более нуклеотидов, где полимер содержит фосфодиэфирный скелет и не включает два мотива A₇, и где rN_3 -rX₂-rC-rU-rC-rA-rX₃-rN₄ не является GCUCAA или UUAUCGUAX₁CUCAC (SEQ ID NO:34), где X₁ представляет собой A или C. В некоторых воплощениях полимер не содержит CCGAGCCGAGCUCACC (SEQ ID NO:35). В некоторых воплощениях изобретения каждый из N₃ и N₄ независимо включает по меньшей мере один A, C, G или U.

В некоторых воплощениях иммуностимулирующие полимеры имеют длину от 4 до 100 звеньев. В других воплощениях полимеры имеют длину от 4 до 20 звеньев. В других воплощениях иммуностимулирующие полимеры имеют длину от 10 до 25 звеньев. В других воплощениях иммуностимулирующие полимеры имеют длину от 15 до 19 звеньев.

Как более подробно описано в нижеприведенных примерах, обнаружили, что CUCA иммуностимулирующего мотива важен для TLR7-подобного иммунного ответа. Неожиданно, что иммунные стимулирующие эффекты более специфичны в отношении фосфодизфирного скелета, чем в отношении фосфортионатного скелета. В некоторых воплощениях иммуностимулирующие полимеры по изобретению имеют более чем один иммуностимулирующий мотив.

Имуностимулирующие полимеры по изобретению являются одноцепочечными. В соответствии со способами по изобретению полимеры не конструируют таким образом, чтобы они содержали последовательность, комплементарную той, которая кодирует последовательность в человеческой клетке, и поэтому они не являются антисмысловыми ORN или молчащими РНК (siRNA). Полимер, который является “не комплементарным”, представляет собой полимер, который не содержит последовательность, способную гибридизоваться строго с конкретным кодирующим участком в клетке-мишени, например, он не гибридизуется в жестких условиях. Поэтому введение полимера, который не комплементарен, не приведет к генному сайленсингу, особенно когда полимеры, описанные в данном изобретении, являются одноцепочечными, по сравнению с двухцепочечными молекулами, используемыми для генного сайленсинга.

Полимеры по изобретению обладают способностью индуцировать иммунный ответ, вызывающий образование значительных количеств IFN- α или IFN- α -родственных молекул относительно фона. IFN- α -родственная молекула представляет собой цитокин или фактор, который связан с экспрессией IFN- α . Эти молекулы включают MIP1- β , IP-10 и MIP1- α , но не ограничиваются этим.

Изобретение в общем относится к иммуностимулирующим полимерам, которые включают иммуностимулирующий РНК-мотив, иммуностимулирующим композициям, содержащим один или более иммуностимулирующих полимеров

по изобретению, и способам применения иммуностимулирующих полимеров и иммуностимулирующих композиций по изобретению. Используемый в данной заявке термин “РНК” должен относиться к двум или более рибонуклеотидам (т.е. молекулам, каждая из которых содержит сахар рибозу, связанный с фосфатной группой и пуриновым или пиримидиновым нуклеоснованием (например гуанином, аденином, цитозином или урацилом), ковалентно связанным вместе посредством 3'-5'-фосфодиэфирной(ых) связи(ей).

Как упомянуто выше, РНК представляет собой полимер из рибонуклеотидов, соединенных через 3'-5'-фосфодиэфирные связи. В конкретных воплощениях иммуностимулирующие полимеры по изобретению представляют собой РНК. В других воплощениях в изобретении предложена иммуностимулирующая композиция, которая содержит химерную молекулу ДНК:РНК, включающую иммуностимулирующий РНК-мотив по изобретению. В одном из воплощений изобретения дезоксирибонуклеотидные остатки молекулы ДНК:РНК включают TCG-мотив на 5'-конце полимера. В одном из воплощений ДНК-компонент химерной молекулы ДНК:РНК включает CpG нуклеиновую кислоту, т.е. агонист TLR9. В одном из воплощений ДНК- и РНК-участки химерной молекулы ДНК:РНК ковалентно связаны через межнуклеотидную фосфатную связь. В еще одном воплощении ДНК- и РНК-участки в химерной молекуле ДНК:РНК ковалентно связаны через линкер, например ненуклеотидный линкер.

В еще одном воплощении по меньшей мере одно звено полимера представляет собой аминокислоту.

В некоторых воплощениях иммуностимулирующие полимеры по изобретению связаны с агонистом TLR9, который не является CpG нуклеиновой кислотой. В некоторых воплощениях иммуностимулирующие полимеры по изобретению связаны с агонистом TLR7 или агонистом TLR8. Агонист может представлять собой дезоксинуклеотид или рибонуклеотид, или он может представлять собой пептид или небольшую молекулу. Иммуностимулирующие полимеры могут быть связаны непосредственно с агонистом или они могут быть соединены через линкер.

Иммуностимулирующие полимеры по настоящему изобретению могут охватывать различные химические модификации и замены по сравнению с

природной РНК и ДНК, включая фосфодиэфирную межнуклеотидную связь, β -D-рибозное звено и/или природное нуклеотидное основание (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил). Примеры химических модификаций известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al. (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:107-129; and Hunziker J et al. (1995) *Mod Synth Methods* 7:331-417. Олигонуклеотид по изобретению может иметь одну или более модификаций, где каждая модификация находится в конкретной фосфодиэфирной межнуклеотидной связи и/или в конкретном β -D-рибозном звене, и/или в конкретном положении природного нуклеотидного основания по сравнению с олигонуклеотидом из той же последовательности, которая состоит из природной ДНК или РНК.

Например, изобретение относится к олигонуклеотиду, который может содержать одну или более модификаций, и где каждая модификация независимо выбрана из:

- а) замены фосфодиэфирной межнуклеотидной связи, расположенной на 3'- и/или 5'-конце нуклеотида, модифицированной межнуклеотидной связью,
- б) замены фосфодиэфирной связи, расположенной на 3'- и/или 5'-конце нуклеотида, дефосфо-связью,
- в) замены сахарного фосфатного звена сахарного фосфатного скелета другим звеном,
- г) замены β -D-рибозного звена модифицированным сахарным звеном, и
- д) замены природного нуклеотидного основания модифицированным нуклеотидным основанием.

Более подробные примеры химической модификации олигонуклеотида представлены далее.

В одном воплощении ORN может иметь по меньшей мере одну стабилизированную межнуклеотидную связь. Обычно связь находится на 5'-или 3'-конце или в непосредственной близости от них, а не в пределах иммуностимулирующего мотива. Фосфодиэфирная межнуклеотидная связь,

расположенная на 3'- и/или 5'-конце нуклеотида, может быть заменена по меньшей мере одной модифицированной межнуклеотидной связью, где модифицированная межнуклеотидная связь, например, выбрана из фосфоротиоатных, фосфородитиоатных, NR¹R²-фосфорамидатных, боранофосфатных, α-гидроксibenзилфосфонатных, фосфат-(C₁-C₂₁)-O-алкилэфирных, фосфат-[(C₆-C₁₂)арил-(C₁-C₂₁)-O-алкил]эфирных, (C₁-C₈)алкилфосфонатных и/или (C₆-C₁₂)арилфосфонатных связей, (C₇-C₁₂)-α-гидроксиметиларильных (например, описанных в WO 95/01363), где (C₆-C₁₂)арил, (C₆-C₂₀)арил и (C₆-C₁₄)арил возможно замещены галогеном, алкилом, алкокси, нитро, циано, и где R¹ и R² представляют собой независимо друг от друга водород, (C₁-C₁₈)-алкил, (C₆-C₂₀)-арил, (C₆-C₁₄)-арил-(C₁-C₈)-алкил, предпочтительно водород, (C₁-C₈)-алкил, предпочтительно (C₁-C₄)-алкил и/или метоксиэтил, или R¹ и R² образуют вместе с несущим их атомом азота 5-6-членное гетероциклическое кольцо, которое может дополнительно содержать дополнительный гетероатом из группы O, S и N. В одном из воплощений ORN имеет 1-5 стабилизированных связей.

Замена фосфодиэфирной связи, расположенной на 3'- и/или 5'-конце нуклеотида, осуществляется дефосфосвязью (дефосфосвязи описаны, например, в Uhlmann E and Peyman A в *"Methods in Molecular Biology"*, Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff), где дефосфосвязь, например, выбрана из дефосфосвязей формацетала, 3'-тиоформацетала, метилгидроксиламина, оксима, метилендиметилгидразо, диметиленсульфона и/или силильных групп.

Сахарное фосфатное звено (т.е. β-D-рибоза и фосфодиэфирная межнуклеотидная связь вместе образуют сахарное фосфатное звено) из сахарного фосфатного скелета (т.е. сахарный фосфатный скелет состоит из сахарных фосфатных звеньев) можно заменить другим звеном, где другое звено, например, подходит для образования "морфолино-производного" олигомера (как описано, например, в Stirchak EP et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41), что представляет собой, например, замещение морфолино-производным звеном; или образование полиамидной нуклеиновой кислоты ("PNA"; как описано, например, в Nielsen PE et al. (1994) *Bioconjug Chem* 5:3-7),

т.е., например, замещением PNA скелетным звеном, например, 2-аминоэтилглицином.

β-Рибозное звено или β-D-2'-дезоксирибозное звено можно заменить модифицированным сахарным звеном, где модифицированное сахарное звено представляет собой, например, β-D-рибозу, α-D-2'-дезоксирибозу, L-2'-дезоксирибозу, 2'-F-2'-дезоксирибозу, 2'-F-арабинозу, 2'-O-(C₁-C₆)алкилрибозу, предпочтительно 2'-O-(C₁-C₆)алкилрибоза представляет собой 2'-O-метилрибозу, 2'-O-(C₂-C₆)алкилрибозу, 2'-[O-(C₁-C₆)алкил-O-(C₁-C₆)алкил]-рибозу, 2'-NH₂-2'-дезоксирибозу, β-D-ксилофуранозу, α-арабинофуранозу, 2,4-дидезокси-β-D-эритрогексопиранозу и карбоциклические (описанные, например, в Froehler J (1992) *Am Chem Soc* 114:8320) и/или аналоги сахаров с открытой цепью (описанные, например в Vandendriessche et al. (1993) *Tetrahedron* 49:7223), и/или бициклосахарные аналоги (описанные, например в Tarkov M et al. (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

Нуклеиновые кислоты также включают замещенные пурины и пиримидины, такие как C-5 пропинпиримидин и 7-деаза-7-замещенные пуриновые модифицированные основания. Wagner RW et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Пурины и пиримидины включают аденин, цитозин, гуанин и тимин, а также другие природные и не природные нуклеооснования, замещенные и незамещенные ароматические группировки, но не ограничиваются этим.

Иммуностимулирующий полимер по изобретению в одном из воплощений может включать одно или более модифицированных нуклеооснований за пределами иммуностимулирующего мотива, т.е. производные А, С, G, Т и U. Конкретные воплощения этих модифицированных нуклеооснований включают 5-замещенные цитозины (например 5-метилцитозин, 5-фторцитозин, 5-хлорцитозин, 5-бромцитозин, 5-йодцитозин, 5-гидроксцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, 5-диформетилцитозин и незамещенный или замещенный 5-алкилцитозин), 6-замещенные цитозины, N4-замещенные цитозины (например N4-этилцитозин), 5-азацитозин, 2-меркаптоцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, цитозиновые аналоги с конденсированными кольцевыми системами (например N,N'-пропиленцитозин или феноксазин), а также урацил и его производные (например 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-

бромвинилурацил, 4-тиоурацил, 5-гидроксиурацил, 5-пропинилурацил),
 тиминовые производные (например 2-тиотимин, 4-тиотимин, 6-замещенные
 тимины), гуанозиновые производные (7-деазагуанин, 7-деаза-7-замещенный
 5 гуанин (такой как 7-деаза-7-(C₂-C₆)-алкинилгуанин), 7-деаза-8-замещенный
 гуанин, гипоксантин, N2-замещенные гуанины (например N2-метилгуанин), 8-
 10 замещенный гуанин (например 8-гидроксигуанин и 8-бромгуанин) и 6-
 тиогуанин), или производные аденозина (5-амино-3-метил-3Н,6Н-тиазоло[4,5-
 d]пиримидин-2,7-дион, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, пури́н, индол, аденин,
 замещенные аденины (например N6-метиладенин, 8-оксоаденин)), но не
 15 ограничиваются этим. Это основание также можно заменять универсальным
 основанием (например 4-метилиндролом, 5-нитроиндролом, 3-нитропирролом, Р-
 основанием, а также К-основанием), ароматической кольцевой системой
 (например бензимидазолом или дихлорбензимидазолом, амидом 1-метил-1Н-
 20 [1,2,4]триазол-3-карбоновой кислоты), ароматической кольцевой системой
 (например фторбензолом или дифторбензолом) или атомом водорода
 (dSpacer). Модифицированные нуклеос основания U представляют собой
 25 производные урацила, такие как дигидроурацил, псевдоурацил, 2-тиоурацил, 4-
 тиюрацил, 5-аминоурацил, 5-(C₁-C₆)-алкилурацил, 5-метилурацил, 5-(C₂-C₆)-
 алкенилурацил, 5-(C₂-C₆)-алкинилурацил, 5-(гидроксиметил)урацил, 5-
 30 хлорурацил, 5-фторурацил или 5-бромурцил. Вышеописанные
 модифицированные нуклеотидные основания и их соответствующие
 нуклеозиды имеются в продаже. Этот перечень является примерным и не
 35 должен рассматриваться как ограничивающий объем изобретения.

Композиции по изобретению охватывают полимеры с вторичной
 структурой или структурой более высокого порядка и без них. Например,
 40 полимер в одном из воплощений включает последовательность нуклеозидов,
 нуклеозидных аналогов или комбинацию нуклеозидов и нуклеозидных аналогов,
 способных формировать вторичную структуру, которая обеспечивается по
 меньшей мере двумя соседними парами оснований, связанных водородными
 45 связями. В одном из воплощений по меньшей мере две соседние пары
 оснований, связанные водородными связями, включают два набора по
 меньшей мере 3 последовательных оснований. Последовательная природа
 50 вовлеченных оснований является термодинамически предпочтительной для

образования так называемого зажима (clamp). Однако последовательные основания могут не требоваться, особенно при высоком содержании GC и/или удлинённой последовательности. Как правило, имеются 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 пар оснований. Пары оснований, связанные водородной связью, в одном из воплощений могут представлять собой классические пары оснований Уотсона-Крика, т.е. G-C, A-U или A-T. В других воплощениях пары оснований, связанные водородной связью, могут представлять собой не классические пары оснований, такие как G-U, G-G, G-A или U-U. В других воплощениях пары оснований, связанные водородной связью, могут представлять собой пары оснований Хугстена или другие пары оснований.

В одном из воплощений вторичная структура представляет собой вторичную структуру типа “стебель-петля”. Вторичная структура типа “стебель-петля” или шпильки может возникать благодаря внутримолекулярному сочетанию связанных водородными связями оснований с комплементарными или по меньшей мере частично комплементарными последовательностями. Комплементарные или частично комплементарные последовательности представляют собой соответственно полные или прерванные инвертированные повторяющиеся последовательности. Например, полимер, имеющий последовательность оснований, определённую как $5'-X_1-X_2-X_3\ldots X_3'-X_2'-X_1'-3'$, где каждый из X_1 и X_1' , X_2 и X_2' , а также X_3 и X_3' может образовывать пару оснований, связанных водородными связями, может включать полный или прерванный инвертированный повтор и обладать потенциальной возможностью загибаться на себя и образовывать вторичную структуру типа “стебель-петля”. Следует принимать во внимание, что полимер, имеющий последовательность оснований, определённую как $5'-X_1-X_2-X_3\ldots X_3'-X_2'-X_1'-3'$, где каждый из X_1 и X_1' , X_2 и X_2' , и X_3 и X_3' может образовывать связанную водородной связью пару оснований, также обладает возможностью образовывать межмолекулярные комплексы через межмолекулярные пары оснований, связанных водородными связями. Если существуют два или более инвертированных повторов, то отдельные полимеры также могут взаимодействовать с образованием не только димерных межмолекулярных комплексов, но также с образованием межмолекулярных комплексов или структур более высокого порядка. Специалистам в данной области техники понятны условия и/или

последовательности, которые могут быть выбраны для предпочтительного формирования одного типа вторичной структуры по сравнению с другими.

В одном аспекте в изобретении предложен конъюгат
5 иммуностимулирующего полимера по изобретению и липофильной группировки. В некоторых воплощениях иммуностимулирующий полимер ковалентно связан с липофильной группировкой. Липофильная группировка в
10 основном будет присутствовать на одном или более концах иммуностимулирующего ORN, имеющего свободные концы, хотя в некоторых воплощениях липофильная группировка может находиться в другом месте в
15 последовательности иммуностимулирующего полимера, и, таким образом, не требуется, чтобы иммуностимулирующий ORN имел свободный конец. В одном из воплощений иммуностимулирующий полимер имеет 3'-конец, а липофильная группировка ковалентно связана с 3'-концом. Липофильная группа в основном
20 может представлять собой холестерил, модифицированный холестерил, производные холестерина, редуцированный холестерин, замещенный холестерин, холестан, C16-алкильную цепь, желчную кислоту, холевую кислоту,
25 таурохолевую кислоту, дезоксихолат, олеиллитохолевую кислоту, олеилхолоновую кислоту, гликолипид, фосфолипид, сфинголипид, изопреноид, такой как стероиды, витамины, такие как витамин Е, насыщенные
30 жирные кислоты, ненасыщенные жирные кислоты, эфиры жирных кислот, такие как триглицериды, пирены, порфирины, тексафирин, адамантан, акридины, биотин, кумарин, флуоресцеин, родамин, тexasский красный, дигоксигенин, диметокситритил, *трет*-бутилдиметилсилил, *трет*-бутилдифенилсилил,
35 цианиновые красители (например, Cu3 или Cu5), краситель Хехста 33258, псорален или ибупрофен. В некоторых воплощениях липофильная группировка выбрана из холестерила, пальмитила и ацила жирной кислоты.
40 Предполагается, что включение одной или более таких липофильных группировок в иммуностимулирующие ORN по изобретению придаст им дополнительную стабильность против разрушения нуклеазами. Когда имеются
45 две или более липофильных группировок в единичных иммуностимулирующих полимерах по изобретению, тогда каждую липофильную группировку можно выбрать независимо от другой.

В одном из воплощений липофильная группа присоединена по 2'-положению нуклеотида иммуностимулирующих полимеров. Липофильную группу альтернативно или дополнительно можно присоединять к гетероциклическому нуклеобазовому нуклеотида иммуностимулирующего полимера. Липофильная группировка может быть ковалентно связана с иммуностимулирующим полимером через подходящую прямую или косвенную связь. В одном из воплощений связь является прямой и представляет собой сложноэфирную или амидную связь. В одном воплощении связь является косвенной и включает спейсерную группировку, например один или более нуклеотидных остатков без азотистого основания, олигоэтиленгликоль, такой как триэтиленгликоль (спейсер 9), или гексаэтиленгликоль (спейсер 18), или алкандиол, такой как бутандиол.

В одном из воплощений иммуностимулирующие полимеры по изобретению комбинированы с катионным липидом. В одном из воплощений катионный липид представляет собой DOTAP (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония метилсульфат). Предполагается, что DOTAP переносит полимеры в клетки и специфически транспортирует в эндосомальный компартмент, где он может высвобождать полимер pH-зависимым образом. Оказавшись в эндосомальном компартменте, полимеры могут взаимодействовать с определенными внутриклеточными TLR, запускать TLR-опосредованные пути передачи сигнала, вовлеченные в образование иммунного ответа. Другие агенты со сходными свойствами, включающие транспорт в эндосомальный компартмент, могут быть использованы вместо или в дополнение к DOTAP. Другие липиды включают, например, EFFECTENE[®] (нелипосомальный липид со специальным ДНК-конденсирующим энхансером) и SUPERFECT[®] (новая действующая дендримерная технология), SMARTICLES[®] (изменяющие заряд частицы, которые становятся положительно заряженными при пересечении клеточных мембран) и Стабильные НуклеиновоКислотные Липидные Частицы (SNALP), которые используют липидный бислой. Липосомы имеются в продаже от Gibco BRL, например, такие как LIPOFECTIN[®] и LIPOFECTACE[™], которые образуют катионные липиды, такие как хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA) и бромид диметилдиоктодециламмония (DDAB). Способы изготовления липосом хорошо

известны в данной области техники и описаны во многих публикациях. Липосомы также описаны в Gregoriadis G (1985) *Trends Biotechnol* 3:235-241. В других воплощениях иммуностимулирующие полимеры по изобретению комбинируют с микрочастицами, циклодекстринами, наночастицами, ноисомами, дендримерами, поликатионными пептидами, вирусосомами и вирусоподобными частицами, или ISCOM®.

В одном из воплощений иммуностимулирующие полимеры по изобретению находятся в форме ковалентно замкнутых, имеющих форму гантели молекул с первичной и вторичной структурой. Как описано ниже, в одном из воплощений такие циклические олигорибонуклеотиды включают два одноцепочечных петлевых сегмента, соединенных с помощью инвертированного двухцепочечного сегмента. В одном из воплощений по меньшей мере одна одноцепочечная петля включает иммуностимулирующий РНК-мотив по изобретению. Другие ковалентно замкнутые, имеющие форму гантели молекулы по изобретению включают химерные молекулы ДНК:РНК, в которых, например двухцепочечный сегмент представляет собой по меньшей мере частично ДНК (например, гомодимерную двухцепочечную ДНК или гетеродимерную ДНК:РНК), и по меньшей мере одна одноцепочечная петля включает иммуностимулирующий РНК-мотив по изобретению. Альтернативно, двухцепочечный сегмент химерной молекулы представляет собой РНК.

В некоторых воплощениях иммуностимулирующие полимеры выделены. Выделенная молекула представляет собой молекулу, которая является по существу чистой и не содержит других веществ, с которыми ее обычно обнаруживают в природе или в системах *in vivo*, для расширенного практического применения и подходящей для ее предполагаемого применения. В частности, иммуностимулирующие полимеры являются довольно чистыми и не содержат других биологических составляющих клетки, таким образом, что их можно использовать, например, в производстве фармацевтических препаратов. Поскольку выделенный иммуностимулирующий полимер по изобретению можно смешивать с фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтическом препарате, иммуностимулирующий полимер может составлять только небольшой процент по массе от массы препарата. Тем не менее, иммуностимулирующий полимер является по существу чистым,

поскольку он был по существу отделен от веществ, с которыми он может быть связан в живых системах.

Для применения в настоящем изобретении иммуностимулирующие полимеры по изобретению можно синтезировать *de novo*, используя или адаптируя любой из многочисленных способов, хорошо известных в данной области техники. Например, β -цианоэтилфосфорамидатный способ (Beaucage SL et al. (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859); нуклеозид-Н-фосфонатный способ (Garegg P et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler BC et al. (1986) *Nucl Acid Res* 14:5399-407; Garegg P et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney BL et al. (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Эти химические способы можно осуществлять с помощью ряда автоматизированных синтезаторов нуклеиновых кислот, имеющих в продаже. Дополнительные способы синтеза, используемые в данном изобретении, описаны в Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:544-84, and Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165.

Олигонуклеотидные синтезы можно проводить либо в растворе, либо на твердофазном носителе. В растворе предпочтительными являются реакции сочетания блоков (димеров, тримеров, тетрамеров и т.д.), тогда как твердофазный синтез предпочтительно осуществляют поэтапным способом с использованием мономерных строительных блоков. Описаны различные химические способы, такие как фосфотриэфирный способ, Н-фосфонатный способ и фосфорамидитный способ (Eckstein F (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford). Поскольку при фосфотриэфирном способе реакционная фосфорная группа находится в состоянии окисления +V, для реакций сочетания используют более реакционные производные фосфора +III в соответствии с фосфорамидитным и Н-фосфонатным подходами. В двух последних подходах фосфор окисляется после стадии сочетания с получением стабильных P(V) производных. Если окислитель представляет собой йод/воду/основание, то после удаления защитных групп получают фосфодиэфиры. Наоборот, если окислитель представляет собой сульфорирующий агент, такой как реагент Beaucage, то после удаления защитных групп получают фосфоротиоаты.

Эффективным способом синтеза олигорибонуклеотидов является комбинация твердофазного синтеза с использованием фосфорамидита, как

исходно описано для олигодезоксинуклеотидов Matteucci and Caruthers. Matteucci MD et al. (1981) *J Am Chem Soc* 103:3185.

Синтез олигорибонуклеотидов сходен с синтезом олигодезоксинуклеотидов с разницей в том, что 2'-гидроксигруппу, присутствующую в олигорибонуклеотидах, необходимо защитить с помощью подходящей защитной группы гидрокси. Мономеры можно защитить, например, с помощью 2'-О-*трет*-бутилдиметилсилильной (TBDMS) группы в мономерных строительных блоках РНК. Однако сообщалось, что при использовании в синтезе РНК мономеров, содержащих 2'-О-триизопропилсилилоксиметильную (TOM) группу (TOM-Protecting-Group™), достигается большая эффективность сочетания, поскольку TOM-защитная группа демонстрирует меньшее стерическое затруднение по сравнению с группой TBDMS. Несмотря на то, что TBDMS защитную группу удаляют с помощью фтора, быстрое удаление защитных групп для TOM-группы достигают с использованием метиламина в этаноле/воде при комнатной температуре. При синтезе олиго(рибо)нуклеотидов предпочтительным является удлинение цепи от 3'- к 5'-концу, которое достигается путем сочетания рибонуклеотидного звена, имеющего 3'-фосфорную (III) группу или ее активированное производное, со свободной 5'-гидроксигруппой другого нуклеотидного звена.

Синтез можно традиционно проводить с использованием автоматизированного ДНК/РНК синтезатора. При этом можно использовать циклы синтеза, рекомендованные поставщиками синтезатора. Для рибонуклеозидных фосфорамидитных мономеров время сочетания больше (например, 400 с) по сравнению с дезоксинуклеозидными мономерами. В качестве твердого носителя можно использовать носитель из пористого стекла с контролируемым размером пор от 500 до 1000 Å (CPG) или органический полимерный носитель, такой как primer support PS200 (Amersham). Твердый носитель обычно содержит первый нуклеозид, такой как 5'-О-диметокситритил-N-6-бензсиладенозин, присоединенный через его 3'-конец. После отщепления 5'-О-диметокситритильной группы трихлоруксусной кислотой удлинение цепи осуществляют с использованием, например, 5'-О-диметокситритил-N-защищенных-2'-О-*трет*-бетилдиметилсилилнуклеозид-3'-О-фосфорамидитов. После последовательных повторяющихся циклов законченный

олигорубонуклеотид отщепляют от носителя и защитные группы удаляют путем обработки концентрированным аммиаком/этанолом (3:1, об.:об.) в течение 24 часов при 30°C. TBDMS-блокирующую группу окончательно отщепляют с использованием триэтиламина/HF. Необработанные олигорубонуклеотиды можно очистить с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), ион-парной обращенно-фазовой HPLC или с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) и охарактеризовать с помощью масс-спектрометрии.

Синтез 5'-конъюгатов проводят непосредственно путем сочетания фосфорамидита молекулы, подлежащей лигированию, к 5'-гидроксигруппе концевого нуклеотида при твердофазном синтезе. Ряд таких фосфорамидитных производных таких лигандов, таких как холестерин, акридин, биотин, псорален, этиленгликоль или аминокислотные остатки, имеются в продаже. Альтернативно, аминокислотные функциональные группы можно вводить во время твердофазного синтеза, что позволяет осуществить постсинтетическую дериватизацию с помощью активированных конъюгатных молекул, таких как активные сложные эфиры, изотиоцианаты или йодоацетамиды.

Синтез 3'-концевых конъюгатов обычно осуществляют с использованием соответственно модифицированных твердых носителей, таких как, например, имеющиеся в продаже холестерин-дериватизированные твердые носители. Однако конъюгацию также можно осуществлять по межнуклеотидным связям, нуклеосообразованиям или на остатках рибозы, таких как 2'-положение рибозы.

Для циклических олигорубонуклеотидов удлинение олигонуклеотидной цепи можно проводить на твердом носителе Nucleotide PS (Glen Research) с использованием стандартного фосфорамидитного способа. Реакцию циклизации затем проводят на твердом носителе с использованием способа фосфодиэфирного сочетания (Alazzouzi et al. (1997) *Nucleosides Nucleotides* 16:1513-14). При окончательном удалении защитных групп гидроксидом аммония по существу только продукт, который переходит в раствор, представляет собой желаемый циклический олигонуклеотид.

Циклические олигорубонуклеотиды по изобретению включают замкнутые кольцевые формы РНК и могут включать одноцепочечную РНК с двухцепочечной РНК или без нее. Например, в одном из воплощений

циклический олигорибонуклеотид включает двухцепочечную РНК и принимает конформацию гантели с двумя одноцепочечными петлями, соединенными с помощью промежуточного двухцепочечного сегмента. Олигодезоксинуклеотиды CpG, ковалентно замкнутые в форме гантели, описаны в патенте США № 6849725. В еще одном воплощении циклический олигорибонуклеотид включает двухцепочечную РНК и принимает конформацию с тремя или более одноцепочечными петлями, соединенными промежуточными двухцепочечными сегментами. В одном из воплощений иммуностимулирующий РНК-мотив локализован в одном или более одноцепочечных сегментах.

Иммуностимулирующие полимеры по изобретению полезны сами по себе или в комбинации с другими агентами, такими как адъюванты. Используемый в данной заявке адъювант относится к веществу, отличному от антигена, которое усиливает активацию иммунной клетки в ответ на антиген, например гуморальный и/или клеточный иммунный ответ. Адъюванты стимулируют накопление и/или активацию вспомогательных клеток для усиления антиген-специфических иммунных ответов. Адъюванты используют для увеличения эффективности вакцин, т.е. антиген-содержащих композиций, используемых для индукции защитного иммунитета против антигена.

Адъюванты могут действовать через два общих механизма, и данный адъювант или адъювантный препарат может действовать посредством одного или обоих механизмов. Первый механизм представляет собой физическое влияние на распределение антигена в клетках или областях, где развиваются антиген-специфические иммунные ответы, и он может представлять собой носитель для доставки, который изменяет биораспределение антигена, включая направленную доставку к специфическим областям или клеточным типам, или создает такой депо-эффект, чтобы антиген медленнее высвобождался в организме, таким образом пролонгируя экспозицию иммунных клеток с антигеном.

Этот класс адъювантов включает квасцы (например гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия); препараты на основе эмульсий, включающие эмульсии воды в масле и масла в воде, приготовленные из минерального или неминерального масла, но не ограничиваются этим. Они могут представлять собой эмульсии масла в воде, такие как Montanide ISA 720 (Seppic, AirLiquide,

Paris, France); MF-59 (эмульсия сквалена в воде, стабилизированная Span 85 и Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, Calif.); а также PROVAX (стабилизирующий детергент и мицеллообразующий агент; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Calif.). Они также могут представлять собой эмульсии воды в масле, такие как Montanide ISA 50 (масляная композиция олеата маннида и минерального масла, Seppic) или Montanide ISA 206 (масляная композиция олеата маннида и минерального масла, Seppic).

Второй адъювантный механизм представляет собой модификатор иммунного ответа или иммуностимулирующий агент. Он приводит к активации иммунных клеток для более хорошей презентации, распознавания или реакции на антигены, и таким образом антиген-специфические ответы усиливаются по кинетике, величине, фенотипу или памяти. Модификаторы иммунного ответа обычно действуют через специфические рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы или один из нескольких других не-TLR путей (например RIG-I), однако пути для некоторых еще неизвестны. Этот класс адъювантов включает сапонины, очищенные из коры дерева *Q. saponaria*, такие как QS21 (гликолипид, который элюируется в 21-м пике при фракционировании с помощью HPLC; Antigenics, Inc., Worcester, Mass.); поли[ди(карбоксилатофенокси)фосфазен (PCPP полимер; Virus Research Institute, USA), Flt3 лиганд и фактор элонгации *Leishmania* (очищенный белок из *Leishmania*; Corixa Corporation, Seattle, Wash.), но не ограничивается этим.

Существует множество адъювантов, которые действуют через TLR. Адъюванты, которые действуют через TLR4, включают производные липополисахаридов, такие как монофосфориллипид A (MPL; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.) и мурамилдипептид (MDP; Ribi), а также треонилмурамилдипептид (t-MDP; Ribi); OM-174 (глюкозаминдисахарид, родственный липиду A; OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland). Флагеллин представляет собой адъювант, действующий через TLR5. Двухцепочечная РНК действует через TLR3. Адъюванты, действующие через TLR7 и/или TLR8, включают одноцепочечную РНК или олигорибонуклеотиды (ORN), а также синтетические низкомолекулярные соединения, которые распознают и активируют TLR, включающие имидазохинолинамины (например имиквимод, резиквимод; 3M). Адъюванты, действующие через TLR9, включают ДНК

вирусного или бактериального происхождения, или синтетические олигонуклеотиды (ODN), такие как CpG ODN.

Адьюванты, обладающие как физическим, так и иммуностимулирующим эффектом, представляют собой соединения, которые обладают обеими вышеприведенными функциями. Этот класс адьювантов включает ISCOMS (иммуностимулирующие комплексы, которые содержат смешанные сапонины, липиды и образуют частицы вирусного размера с порами, которые могут удерживать антиген; CSL, Melbourne, Australia), Pam3Cys, SB-AS2 (система адьювантов #2 SmithKline Beecham, представляющая собой эмульсию масла в воде, содержащую MPL и QS21; SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Belgium), SB-AS4 (система адьювантов #4 SmithKline Beecham, содержащая квасцы и MPL; SBB, Belgium), неионные блок-сополимеры, образующие мицеллы, такие как CRL 1005 (они содержат линейную цепь гидрофобного полиоксипропилена, фланкированного цепями полиоксиэтилена, Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.), и Syntex Adjuvant Formulation (SAF, эмульсия масла в воде, содержащая Tween 80 и неионный блок-сополимер; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colo.), Montanide IMS (например IMS 1312, наночастицы на основе воды в комбинации с растворимым иммуностимулятором, Seppic), а также многие описанные ранее носители для доставки, но не ограничиваются этим.

Также предложена композиция, которая включает иммуностимулирующий полимер по изобретению вместе с другим адьювантом, где другой адьювант представляет собой катионный полисахарид, такой как хитозан, или катионный пептид, такой как протамин, полиэфир, полимолочная кислота, полигликолевая кислота или сополимер одной или более чем одной из вышеперечисленных.

Также предложена композиция, которая включает иммуностимулирующий полимер по изобретению вместе с другим адьювантом, где другой адьювант представляет собой цитокин. В одном из воплощений композиция представляет собой конъюгат иммуностимулирующего полимера по изобретению и цитокина.

Цитокины представляют собой растворимые белки и гликопротеины, продуцируемые многими типами клеток, которые опосредуют воспалительные и иммунные реакции. Цитокины опосредуют взаимодействие между клетками

иммунной системы, действуя локально, а также системно, для рекрутинга клеток и регуляции их функции и пролиферации. Категории цитокинов включают медиаторы и регуляторы врожденного иммунитета, медиаторы и регуляторы приобретенного иммунитета, а также стимуляторы гемопоэза. Цитокины включают интерлейкины (например IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, а также среди прочих интерлейкины 19-32 (IL-19 - IL-32)), хемокины (например, среди прочих IP-10, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, эотаксин, I-TAC и BCA-1), а также другие цитокины, включающие интерфероны 1 типа (например IFN- α и IFN- β), интерферон 2 типа (например IFN- γ), фактор некроза опухолей альфа (TNF- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), и различные колониестимулирующие факторы (CSF), включающие GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов), G-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов) и M-CSF (колониестимулирующий фактор макрофагов).

Также предложена композиция, которая включает иммуностимулирующий полимер по изобретению вместе с иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой CpG. В одном из воплощений композиция представляет собой конъюгат иммуностимулирующего полимера по изобретению и нуклеиновой кислоты CpG, например конъюгат РНК:ДНК.

Используемая в данной заявке иммуностимулирующая нуклеиновая кислота CpG относится к природной или синтетической последовательности ДНК, которая включает CpG-мотив и которая стимулирует активацию или пролиферацию клеток иммунной системы. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты CpG описаны в ряде выданных патентов, опубликованных заявках на патенты и других публикациях, включая патенты США №№ 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 и 6339068. В одном из воплощений иммуностимулирующая нуклеиновая кислота CpG представляет собой олигодезоксинуклеотид CpG (CpG ODN) длиной 6-100 нуклеотидов. В одном из воплощений иммуностимулирующая нуклеиновая кислота CpG представляет собой олигодезоксинуклеотид CpG (CpG ODN) длиной 8-40 нуклеотидов.

В некоторых воплощениях полимер включает динуклеотид CG. В других воплощениях полимер не содержит динуклеотид CG.

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты CpG включают различные классы нуклеиновых кислот CpG. Один класс способен активировать В-клетки, но относительно слаб в индукции IFN- α и активации NK-клеток; этот класс обозначен как класс В. Нуклеиновые кислоты CpG класса В обычно полностью стабилизированы и включают неметилированный динуклеотид CpG в пределах определенных предпочтительных контекстов оснований. См., например патенты США №№ 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 и 6339068. Другой класс способен индуцировать IFN- α и NK клеточную активацию, но относительно слаб в стимуляции В-клеток; этот класс был обозначен как класс А. Класс А нуклеиновых кислот CpG обычно имеет палиндромную фосфодиэфирную CpG динуклеотид-содержащую последовательность длиной по меньшей мере 6 нуклеотидов и стабилизированные поли-G последовательности на одном из 5'- или 3'-концов или на обоих 5'- или 3'-концах. См., например, опубликованную международную заявку на патент WO 01/22990. Еще один класс нуклеиновых кислот CpG активирует В-клетки и NK-клетки и индуцирует IFN- α ; этот класс назван классом С. Класс С нуклеиновых кислот CpG, как охарактеризовано сначала, обычно является полностью стабилизированным, включает последовательность типа класса В и GC-богатый палиндром или почти палиндром. Этот класс описан в опубликованной заявке на патент США № 2003/0148976, содержание которой включено в данную заявку посредством ссылки.

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты CpG также включают так называемые мягкие и полумягкие нуклеиновые кислоты CpG, как описано в опубликованной заявке на патент США 2003/0148976, содержание которой включено в данную заявку посредством ссылки. Такие мягкие и полумягкие иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты CpG содержат комбинацию устойчивых к нуклеазам и чувствительных к нуклеазам межнуклеотидных последовательностей, где различные типы связей расположены в соответствии с определенными правилами.

В изобретении в одном из аспектов предложена вакцина, которая включает иммуностимулирующий полимер по изобретению и антиген.

Используемый в данной заявке "антиген" относится к любой молекуле, способной распознавать Т-клеточный антигенный рецептор или В-клеточный антигенный рецептор. Данный термин широко включает любой тип молекулы, которая распознается иммунной системой хозяина как чужеродная. Антигены обычно включают, но не ограничиваются этим, клетки, клеточные экстракты, белки, полипептиды, пептиды, полисахариды, полисахаридные конъюгаты, пептидные и непептидные миметики полисахаридов и других молекул, малые молекулы, липиды, гликолипиды, полисахариды, углеводороды, вирусы и вирусные экстракты, а также многоклеточные организмы, такие как паразиты, и аллергены. В отношении антигенов, которые представляют собой белки, полипептиды или пептиды, такие антигены могут включать молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие антигены. Более конкретно, антигены включают, но не ограничиваются этим, раковые антигены, которые включают раковые клетки и молекулы, экспрессирующиеся в раковых клетках или на них; микробные антигены, которые включают микробы и молекулы, экспрессирующиеся в микробах или на них; аллергены и другие ассоциированные с заболеваниями молекулы, такие как аутореактивные Т-клетки. Соответственно, в изобретении в некоторых воплощениях предложены вакцины против раковых, инфекционных заболеваний, аллергии, против аддикции, против заболеваний, вызванных аномально свернутыми белками, аутоиммунным заболеванием и контролем холестерина.

Вакцина против инфекционного заболевания может быть профилактической или терапевтической. Антиген в вакцине может быть полностью живым (ослабленным), полностью убитым/инактивированным, рекомбинантным живым ослабленным, очищенным субъединичным, рекомбинантным субъединичным или представлять собой пептид. Вакцина может включать дополнительные адъюванты или комбинации адъювантов. Дополнительные адъюванты могут представлять собой такие адъюванты, которые оказывают депо-эффект (например алюминиевые квасцы), и иммунный модификатор (например либо другой агонист TLR, либо тот, который действует не через TLR-путь), или адъювант, который оказывает оба этих эффекта, таких как иммуностимулирующий комплекс (ISCOM®). Адъюванты более подробно описаны ниже.

Противораковая вакцина также может быть профилактической или терапевтической. Раковый антиген может представлять собой целую клетку (индивидуальная DC вакцина), или один или более полипептидов или пептидов. Они, как правило, присоединены к молекуле-носителю. Вакцина дополнительно может включать дополнительные адъюванты или комбинации адъювантов, такие как описанные выше. Раковые антигены более подробно обсуждаются ниже.

В отношении вакцины для лечения аллергии антиген представляет собой аллерген или фрагмент аллергена. Аллерген может содержаться в носителе для доставки или может быть связан с носителем для доставки. Аллерген может быть связан с иммуностимулирующим полимером. Аллергены более подробно обсуждаются ниже.

Вакцины для лечения аддикции могут быть полезны для лечения, например, никотиновой аддикции, кокаиновой аддикции, метамфетаминовой или героиновой аддикции. В этих случаях молекула, вызывающая аддикцию, представляет собой природную молекулу или гаптен. "Антигены" для включения в вакцины против аддикции типично представляют собой небольшие молекулы и могут быть конъюгированы с белком-носителем или другой частицей-носителем, или они могут быть включены в вирусоподобную частицу.

Вакцины для лечения заболеваний, вызванных аномально свернутыми белками, могут быть полезны для лечения заболеваний, таких как трансмиссивная губчатая энцефалопатия (вариант болезни Крейтцфельда-Якоба). В этом случае "антиген" может представлять собой прион скрепи, который может быть связан с белком-носителем или живым ослабленным вектором. Один из примеров вакцины против болезни Альцгеймера может представлять собой, например, вакцину, нацеленную на бета-амилоидный пептид или белок.

Также предложены вакцины для лечения аутоиммунных заболеваний. Эти вакцины могут быть полезны для лечения аутоиммунных заболеваний, при которых идентифицирована молекула, которую распознают аутоиммунные клетки. Например, вакцина против аутореактивных Т-клеток, которые реагируют с миелином, может быть полезна для лечения рассеянного склероза.

Также предложены вакцины, полезные для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и состояний. Вакцина может быть нацелена на молекулу, которая, как известно, вносит вклад в этиологию заболевания, такую как липопротеины, холестерин и молекулы, вовлеченные в метаболизм холестерина. Вакцина для контроля холестерина будет содержать, например, белок-переносчик холестерилового эфира (СЕТР) в качестве антигена. СЕТР облегчает обмен холестерина из антиатерогенных апо А-1-содержащих частиц HDL (липопротеины высокой плотности) на атерогенные апо В-содержащие VLDL (липопротеины очень низкой плотности) и LDL (липопротеины низкой плотности). Такая вакцина может быть использована для лечения высокого уровня холестерина или замедлять развитие атеросклероза. Вакцина может быть использована для лечения других сердечно-сосудистых заболеваний и состояний, для которых известна молекула-мишень.

В одном из аспектов изобретения предложено применение иммуностимулирующего полимера по изобретению для изготовления лекарственного средства для вакцинации субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложен способ изготовления вакцины. Этот способ включает стадию приведения иммуностимулирующего полимера по изобретению в тесную ассоциацию с антигеном и возможно фармацевтически приемлемым носителем.

В некоторых воплощениях иммуностимулирующий полимер и антиген или аллерген конъюгированы. Антиген и иммуностимулирующий полимер могут быть конъюгированы непосредственно, или они могут быть конъюгированы опосредованно с помощью линкера.

Используемый в данной заявке термин "микробный антиген" означает антиген микроорганизма и включает вирусы, бактерии, паразиты и грибы, но не ограничивается этим. Такие антигены включают интактные микроорганизмы, а также природные изоляты и их фрагменты или производные, а также синтетические соединения, идентичные или аналогичные природным антигенам микроорганизмов и индуцирующие иммунный ответ, специфический для такого микроорганизма. Соединение считается аналогичным природному антигену микроорганизма, если оно индуцирует иммунный ответ (гуморальный и/или клеточный) на природный антиген микроорганизма. Такие антигены стандартно

используются в данной области техники и хорошо известны специалисту в данной области техники.

Вирусы представляют собой небольшие инфекционные агенты, которые обычно содержат сердцевину из нуклеиновой кислоты и белковую оболочку, но не являются самостоятельными живыми организмами. Вирусы также могут принимать форму инфекционных нуклеиновых кислот, не содержащих белок. Вирус не может жить вне живой клетки, в которой он может реплицироваться. Вирусы проникают в специфические живые клетки либо посредством эндоцитоза, либо посредством прямого инъекции ДНК (фага) и размножаются в этих клетках, вызывая заболевание. Затем размноженный вирус может высвобождаться и инфицировать другие клетки. Некоторые вирусы являются ДНК-содержащими вирусами, а другие вирусы – РНК-содержащими вирусами. В некоторых аспектах настоящее изобретение также предназначено для лечения заболеваний, в развитии которых участвуют прионы, таких как губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (т.е. коровье бешенство, BSE) или инфекция скрепи у животных, или болезнь Крейтцфельда-Якоба у людей.

Вирусы включают энтеровирусы (включая вирусы, принадлежащие к семейству *picornaviridae*, такие как полиовирус, вирус коксаки, ЕСНО-вирус, но не ограничиваясь этим), ротавирусы, аденовирус и вирус гепатита А, В, С, D и Е, но не ограничиваются этим. Конкретные примеры вирусов, обнаруженных у человека, включают *Retroviridae* (например вирусы иммунодефицита человека, такие как HIV-1 (также обозначаемые HTLV-III, LAV, или HTLV-III/LAV, или HIV-III; и другие изоляты, такие как HIV-LP); *Picornaviridae* (например полиовирусы, вирус гепатита А; энтеровирусы, человеческие вирусы Коксаки, риновирусы, ЕСНО-вирусы); *Calciviridae* (например штаммы, вызывающие гастроэнтерит); *Togaviridae* (например вирусы лошадиного энцефалита, вирусы коревой краснухи); *Flaviviridae* (например вирусы денге, вирусы энцефалита, вирусы желтой лихорадки); *Coronaviridae* (например коронавирусы); *Rhabdoviridae* (например вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); *Filoviridae* (например вирусы Эбола); *Paramyxoviridae* (например вирусы парагриппа, вирус паротита, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); *Orthomyxoviridae* (например вирусы гриппа); *Bunyaviridae* (например вирусы Хантаан, буньявирусы, флебовирусы и найровирусы); *Arenaviridae* (вирусы

геморрагической лихорадки); *Reoviridae* (например реовирусы, орбивирусы и ротавирусы); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (вирус гепатита В) ; *Parvoviridae* (парвовирусы); *Papovaviridae* (папилломавирусы, полиомавирусы); *Adenoviridae* (большинство аденовирусов); *Herpesviridae* (вирус простого герпеса (HSV) 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (CMV)); *Poxviridae* (вирусы натуральной оспы, вирусы коревой оспы, поксвирусы); *Iridoviridae* (например вирус африканской лихорадки свиней), и другие вирусы: вирус острого ларинготрахеобронхита, альфавирус, вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши, вирус псевдочумы птиц, вирус Нипах, вирус Norwalk, папилломавирус, вирус парагриппа, вирус птичьего гриппа, вирус SARS (тяжелый острый респираторный синдром), вирус Западного Нила, но не ограничиваются этим.

Бактерии представляют собой одноклеточные организмы, которые размножаются не половым путем, т.е. посредством простого деления. Классификацию бактерий и присвоение им названий осуществляют, исходя из их морфологии, реакции окрашивания, потребности в питательных веществах и их метаболизма, антигенной структуры, химического состава и генетической гомологии. Бактерии могут быть классифицированы на три группы на основе их морфологических форм: сферические (кокки) и палочковидные (бациллы), изогнутые или спиральные (вибрио, *Campylobacter*, спириллы и спирохеты). Бактерии также обычно характеризуют на основании реакций их окрашивания и по этому признаку они подразделяют на два класса: грамположительные и грамотрицательные бактерии. Окрашивание по Граму относится к методу окрашивания, который обычно осуществляется в микробиологических лабораториях. Грамположительные микроорганизмы сохраняют окраску после процедуры окрашивания и становятся темно-фиолетовыми. Грамотрицательные микроорганизмы не сохраняют окраску, но при окрашивании контрастным красителем становятся розовыми.

Инфекционные бактерии включают грамотрицательные и грамположительные бактерии, но не ограничиваются этим. Грамположительные бактерии включают *Pasteurella sp.*, *Staphylococci sp.* и *Streptococcus sp.*, но не ограничиваются этим. Грамотрицательные бактерии включают *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* и *Salmonella sp.*, но не ограничиваются этим. Конкретные

примеры инфекционных бактерий включают *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sp. (например *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*,
 5 *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (стрептококки группы А), *Streptococcus agalactiae* (стрептококки группы В), *Streptococcus* (группы *viridans*), *Streptococcus faecalis*,
 10 *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, патогенные *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp.,
 15 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* и *Actinomyces israelii*, но не ограничиваются этим.
 20

Паразиты представляют собой организмы, выживание которых зависит от других организмов и которым для продолжения их жизненного цикла
 25 необходимо проникать в другой организм или инфицировать этот организм. Питание и выживание паразита обеспечиваются инфицированным организмом, т.е. хозяином. Хотя термин “паразит” в широком смысле может включать все
 30 инфекционные агенты (т.е. бактерии, вирусы, грибки, простейшие и гельминты), вообще говоря, этот термин относится только к простейшим, гельминтам и членистоногим эктопаразитам (например иксодовым клещам, обыкновенным клещам и т.п.). Простейшие представляют собой одноклеточные организмы,
 35 которые могут самовоспроизводиться внутриклеточно и внеклеточно, в частности, в крови, кишечном тракте или внутриклеточном матриксе тканей. Гельминты представляют собой многоклеточные организмы, которые почти
 40 всегда являются внеклеточными (за исключением *Trichinella* spp.). Гельминтам для их воспроизведения обычно необходимо покинуть первичного хозяина и внедриться во вторичного хозяина. В противоположность этим вышеописанным
 45 классам членистоногие эктопаразиты образуют паразитическое сообщество на внешней поверхности организма-хозяина.

Паразиты подразделяются на внеклеточных паразитов и облигатных
 50 внутриклеточных паразитов. Примеры таких паразитов включают *Plasmodium*

falciparum, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*,
Plasmodium knowlesi, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Trypanosoma cruzi*,
Toxoplasma gondii, *Trichinella spiralis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*,
5 *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma*
rhodesiense и *Schistosoma mansoni*, но не ограничиваются этим.

Грибы представляют собой эукариотические микроорганизмы, из которых
10 лишь некоторые вызывают инфекционные заболевания у позвоночных
млекопитающих. Поскольку грибы представляют собой эукариотические
микроорганизмы, они значительно отличаются от прокариотических бактерий
15 по размеру, структурной организации, жизненному циклу и механизму
размножения. Грибы обычно классифицируются на основании их
морфологических признаков, способов репродукции и характеристик культур.
Хотя грибы могут вызывать у субъектов заболевания различных типов, такие
20 как респираторные аллергии после вдыхания грибковых антигенов,
интоксикации грибами вследствие попадания в организм токсических веществ,
таких как токсин *Amanita phalloides* и фаллотоксин, продуцируемый ядовитыми
25 грибами, и афлатоксины, продуцируемые грибами рода *Aspergillus* sp., но при
этом не все грибы вызывают инфекционные заболевания.

Инфекционные грибы могут вызывать системные или поверхностные
30 инфекции. Первичная системная инфекция может возникать и у здоровых
субъектов, а условно-патогенные инфекции чаще всего возникают у субъектов с
нарушенным иммунитетом. Наиболее распространенные грибковые патогены,
35 вызывающие первичную системную инфекцию, включают *Blastomyces*,
Coccidioides и *Histoplasma*. Распространенные грибы, вызывающие условно-
патогенные инфекции у субъектов с нарушенным иммунитетом или с
ослабленным иммунитетом, включают *Candida albicans*, *Cryptococcus*
40 *neoformans* и различные грибы рода *Aspergillus* sp, но не ограничиваются этим.
Системные грибковые инфекции представляют собой инвазивные инфекции
внутренних органов. Микроорганизм обычно проникает в организм субъекта
45 через легкие, желудочно-кишечный тракт или через внутривенные катетеры.
Инфекции таких типов могут быть вызваны грибами, ответственными за
развитие первичной патогенной инфекции или условно-патогенной инфекции.

Поверхностные грибковые инфекции характеризуются ростом грибов на внешней поверхности организма без инвазии внутренних тканей. Типичные поверхностные грибковые инфекции включают кожные грибковые инфекции, поражающие кожу, волосы или ногти.

Заболевания, ассоциированные с грибковыми инфекциями, включают аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, хромобластомикоз, кокцидиоидомикоз, криптококкоз, грибковые инфекции глаз, грибковые инфекции волос, ногтей и кожи, гистоплазмоз, лобомикоз, мицетому, отомикоз, паракокцидиоидомикоз, диссеминированное заболевание, вызываемое *Penicillium marneffei*, феогифомикоз, риноспоридиоз, споротрихоз и зигомикоз.

Другие важные с медицинской точки зрения микроорганизмы широко описаны в литературе, см., например, C.G.A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain, 1983, которая включена в данную заявку посредством ссылки. Каждый из приведенных перечней является иллюстративным и не предназначен для ограничения объема изобретения.

Используемые в данной заявке термины “раковый антиген” и “опухолевый антиген” являются синонимами и означают такие соединения, как пептид, белок, липопротеин или гликопротеин, который ассоциирован с опухолевыми или раковыми клетками и который способен стимулировать иммунный ответ при его экспрессии на поверхности антигенпредставляющей клетки в связи с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС). Раковые антигены, которые дифференциально экспрессируются раковыми клетками, могут быть использованы для нацеливания на раковые клетки. Раковые антигены представляют собой антигены, которые могут, вероятно, стимулировать опухоль-специфические иммунные ответы. Некоторые из этих антигенов кодируются, хотя необязательно экспрессируются, нормальными клетками. Эти антигены могут быть охарактеризованы как антигены, которые обычно являются “молчащими” (т.е. не экспрессируются) в нормальных клетках; антигены, которые экспрессируются только на определенных стадиях дифференцировки; и временно экспрессируемые антигены, такие как эмбриональные и фетальные антигены. Другие раковые антигены кодируются мутантными клеточными генами, такими как онкогены (например активированный онкоген *ras*), гены-супрессоры (например мутантный p53) и

слитые белки, являющиеся результатом внутренних делеций или хромосомных транслокаций. Другие раковые антигены могут кодироваться вирусными генами, такими как гены, находящиеся на опухолевых РНК- и ДНК-вирусах.

5 Раковые антигены могут быть получены из раковых клеток путем получения неочищенных экстрактов раковых клеток, например, как описано в Cohen P. A. et al. (1994) *Cancer Res.* 54: 1055-8, путем частичной очистки
10 антигенов, с применением рекомбинантной технологии или посредством синтеза известных антигенов *de novo*. Раковые антигены включают рекомбинантно экспрессируемые антигены, их иммуногенную часть или целую
15 опухоль или раковую опухоль, или клетку, но не ограничиваются этим. Такие антигены могут быть выделены или получены рекомбинантными способами или любыми другими способами, известными в данной области техники.

20 Примеры опухолевых антигенов включают MAGE, MART-1/мелан-А, gp100, дипептидилпептидазу IV (DPPIV), белок, связывающий аденозиндезаминазу (ADAбp), циклофилин b, антиген, ассоциированный с толстой кишкой (CRC)-C017-1A/GA733, карциноэмбриональный антиген (CEA) и
25 его иммуногенные эпитопы CAP-1 и CAP-2, etv6, am11, антиген предстательной железы (PSA) и его иммуногенные эпитопы PSA-1, PSA-2, и PSA-3, мембранный антиген предстательной железы (PSMA), Т-клеточный
30 рецептор/CD3-зета-цепь, семейство опухолевых антигенов MAGE (например MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2),
35 MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), семейство опухолевых антигенов GAGE (например GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9),
40 BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназу, p53, антигены семейства MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -фетопроtein, E-кадгерин, α -катенин, β -катенин и γ -катенин, p120ctn, gp100^{Pmel117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, белок аденоматозного кишечного полипоза (APC), фодрин,
45 коннексин 37, Ig-идиотип, p15, gp75, ганглиозиды GM2 и GD2, вирусные продукты, такие как белки человеческого папилломавируса, опухолевые антигены семейства Smad, Imp-1, PIA, EBV-кодируемый ядерный антиген
50 (EBNA)-1, гликогенфосфорилаза головного мозга, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40),

SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7, и c-erbB-2. Этот список не является исчерпывающим.

Используемый в данной заявке термин “аллерген” означает молекулу, способную вызывать иммунный ответ, характеризующийся продуцированием IgE. Аллерген также представляет собой вещество, которое может индуцировать аллергический или астматический ответ у чувствительного субъекта. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термин “аллерген” означает конкретный тип антигена, который может запускать аллергический ответ, опосредованный IgE-антителом.

Список аллергенов является огромным и может включать пыльцу, яды насекомых, перхоть животных, споры грибов и лекарственные средства (например пенициллин). Примеры природных аллергенов животного и растительного происхождения включают белки, характерные для таких видов, как собаки (*Canis familiaris*); дерматофагоиды (например *Dermatophagoides farinae*); кошки (*Felis domesticus*); амброзия (*Ambrosia artemisiifolia*); плевел многолетний (например *Lolium perenne* и *Lolium multiflorum*); криптомерия (*Cryptomeria japonica*); альтернария (*Alternaria alternata*); Alder; ольха (*Alnus gultinosa*); береза (*Betula verrucosa*); дуб (*Quercus alba*); маслина (*Olea europa*); артемизия (*Artemisia vulgaris*); подорожник (например *Plantago lanceolata*); постенница (например *Parietaria officinalis* и *Parietaria judaica*); блателла (например *Blattella germanica*); пчела (например *Apis multiflorum*); кипарис (например *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* и *Cupressus macrocarpa*); можжевельник (например *Juniperus sabinooides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* и *Juniperus ashei*); туя (например *Thuja orientalis*); кипарисовик (например *Chamaecyparis obtusa*); таракан (например *Periplaneta americana*); пырей (например *Agropyron repens*); рожь (например *Secale cereale*); пшеница (например *Triticum aestivum*); ежа (например *Dactylis glomerata*); овсяница (например *Festuca elatior*); мятлик (например *Poa pratensis* и *Poa compressa*); овес (например *Avena sativa*); бухарник (например *Holcus lanatus*); душистый колосок (например *Anthoxanthum odoratum*); райграсс (например *Arrhenatherum elatius*); полевица (например *Agrostis alba*); тимopheевка (например *Phleum pratense*); канареечник (например *Phalaris arundinacea*);

гречка (например *Paspalum notatum*); сорго (например *Sorghum halepensis*) и костер (например *Bromus inermis*).

В одном из аспектов изобретения предложен конъюгат
5 иммуностимулирующего полимера по изобретению и антигена. В одном из воплощений иммуностимулирующий полимер по изобретению ковалентно связан с антигеном. Ковалентная связь между иммуностимулирующим
10 полимером и антигеном может иметь любой подходящий тип ковалентной связи, при условии, что иммуностимулирующий полимер и антиген, связанные таким образом, сохраняют измеримую функциональную активность каждого индивидуального компонента. В одном из воплощений ковалентная связь
15 является прямой. В еще одном воплощении ковалентная связь является опосредованной, например, через линкерную группировку. Ковалентно связанный иммуностимулирующий полимер и антиген могут подвергаться в
20 клетке процессингу с высвобождением одного из другого. Таким образом, доставка в клетку любого из компонентов может быть усилена по сравнению с его доставкой при введении в виде отдельного препарата или отдельного
25 компонента. В одном из воплощений антиген представляет собой собственно антиген, т.е. он является предварительно сформированным антигеном.

В одном из аспектов изобретения предложена фармацевтическая
30 композиция, которая включает композицию по изобретению, в ассоциации с носителем для доставки. В различных воплощениях носитель для доставки может быть выбран из катионного липида, липосомы, кохлеата, виросомы,
35 иммуностимулирующего комплекса (ISCOM[®]), микрочастицы, микросферы, наносферы, однослойной везикулы (LUV), многослойной везикулы, эмульсомы и поликатионного пептида, липоплекса, полиплекса, липополиплекса, эмульсии
40 воды в масле (W/O), эмульсии масла в воде (O/W), множественной эмульсии воды в масле в воде (W/O/W), микроэмульсии, наноэмульсии, мицеллы, дендримера, виросомы, вирусоподобной частицы, полимерной наночастицы (такой как наносфера или нанокапсула), полимерной микрочастицы (такой как
45 микросфера или микрокапсула), хитозана, циклодекстрина, ниосомы или ISCOM[®] и, возможно, фармацевтически приемлемого носителя.

Фармацевтически приемлемые носители обсуждаются ниже.
50 Фармацевтическая композиция по изобретению возможно может

дополнительно включать антиген. Композицию по изобретению вместе с антигеном, когда он присутствует, приводят в физическую ассоциацию с носителем для доставки с использованием подходящего способа.

Иммуностимулирующая композиция может содержаться в носителе для доставки, или она может быть представлена на поверхности носителя для доставки, контактирующей с растворителем, или в ассоциации с ней. В одном из воплощений иммуностимулирующий полимер представлен на поверхности носителя для доставки, контактирующей с растворителем, или в ассоциации с ней, и антиген, если он присутствует, содержится в устройстве для доставки. В другом воплощении и иммуностимулирующий полимер, и антиген представлены на поверхности носителя для доставки, контактирующей с растворителем, или в ассоциации с ней. В еще одном воплощении антиген представлен на поверхности носителя для доставки, контактирующей с растворителем, или в ассоциации с ней, и иммуностимулирующий полимер содержится в носителе для доставки. В еще одном воплощении и иммуностимулирующий полимер, и антиген, если антиген включен, содержатся в носителе для доставки.

В изобретении также предложены способы применения иммуностимулирующих композиций по изобретению. В одном из аспектов изобретения предложен способ активации иммунной клетки. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию приведения иммунной клетки *in vitro* или *in vivo* в контакт с эффективным количеством композиции по изобретению для активации иммунной клетки. Композиция по изобретению может возможно включать антиген. Используемый в данной заявке термин "иммунная клетка" относится к любой клетке, происходящей из костного мозга, которая может принимать участие во врожденном или адаптивном иммунном ответе. Клетки иммунной системы включают дендритные клетки (DC), клетки-естественные киллеры (NK), моноциты, макрофаги, гранулоциты, В-лимфоциты, плазматические клетки, Т-лимфоциты и их клетки-предшественники, но не ограничиваются этим. В одном из воплощений иммунная клетка представляет собой иммунную клетку, способную продуцировать IFN- α , например плазмацитоидную дендритную клетку (pDC). В некоторых воплощениях иммунная клетка представляет собой клетку,

экспрессирующую TLR7. В контексте данного изобретения способ не включает препарат с липофектином в количестве, эффективном для индукции терапевтически значимой продукции IFN- α . В одном из воплощений иммунные клетки не продуцируют терапевтически значимых количеств TNF- α в ответ на полимер.

Используемый в данной заявке термин “эффективное количество” относится к количеству вещества, которое необходимо или достаточно для достижения желаемого биологического эффекта. Эффективное количество может, но не обязательно, ограничиваться количеством, вводимым при однократном введении. В одном из воплощений композиции по изобретению могут быть использованы для активации иммунной клетки путем индукции приведения иммунной клетки в активированное состояние, которое ассоциировано с иммунным ответом. Активация иммунной клетки относится к индукции и усилению иммунного ответа. Используемый в данной заявке термин “иммунный ответ” относится к любому аспекту врожденного или адаптивного иммунного ответа, который отражает активацию иммунной клетки для пролиферации, для осуществления эффекторной иммунной функции или для продукции генного продукта, вовлеченного в иммунный ответ. Генные продукты, вовлеченные в иммунный ответ, могут включать секретируемые продукты (например, антитела, цитокины и хемокины), а также внутриклеточные молекулы и молекулы клеточной поверхности, характерные для иммунной функции (например, некоторые антигены кластера дифференцировки (CD), транскрипционные факторы и генные транскрипты). Термин “иммунный ответ” может быть применим к единичной клетке или к популяции клеток.

Продукцию цитокинов можно оценить несколькими способами, хорошо известными в данной области техники, включающими анализы биологического ответа, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализ с использованием клеточного сортера с возбуждением флуоресценции (FACS) и полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR). В одном из воплощений иммунный ответ включает продукцию IFN- α .

В одном из воплощений иммунный ответ включает повышенную регуляцию поверхностных маркеров активации иммунных клеток, таких как CD25, CD80, CD86 и CD154. Способы измерения экспрессии таких маркеров на

клеточной поверхности хорошо известны в данной области техники и включают FACS-анализ.

Для измерения иммунного ответа в клетке или популяции клеток в одном из воплощений клетка или популяция клеток экспрессирует TLR7. Клетка может экспрессировать TLR естественным образом или ею можно манипулировать для экспрессии TLR путем введения в клетку подходящего экспрессирующего вектора для TLR. В одном из воплощений клетку или популяцию клеток получают в виде мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В одном из воплощений клетку или популяцию клеток получают в виде клеточной линии, экспрессирующей TLR. В одном из воплощений клетку или популяцию клеток получают в виде временного трансфектанта, экспрессирующего TLR. В одном из воплощений клетку или популяцию клеток получают в виде стабильного трансфектанта, экспрессирующего TLR.

Кроме того, для применения в измерении иммунного ответа в клетке или популяции клеток может удобно вводить в клетку или популяцию клеток репортерную конструкцию, которая отвечает за внутриклеточную передачу сигнала через TLR. В одном из воплощений такой репортер представляет собой ген, помещенный под контроль промотора NF- κ B. В одном из воплощений ген, помещенный под контроль промотора, представляет собой люциферазу. В подходящих условиях активации люциферазная репортерная конструкция экспрессируется и излучает детектируемый световой сигнал, который может быть количественно измерен с использованием люминометра. Такие репортерные конструкции и другие подходящие репортерные конструкции имеются в продаже.

Изобретение также охватывает применение бесклеточных способов детекции активации TLR.

В некоторых аспектах изобретение относится к композициям и способам применения в терапии. Иммуностимулирующие композиции по изобретению могут быть использованы самостоятельно или комбинированы с другими терапевтическими агентами. Иммуностимулирующую композицию и другой терапевтический агент можно вводить одновременно или последовательно. При одновременном введении иммуностимулирующей композиции по изобретению и другого терапевтического агента, их можно вводить в одном или

отдельных препаратах, но их можно вводить одновременно. Дополнительно, при одновременном введении иммуностимулирующей композиции по изобретению и другого терапевтического, их можно вводить одним и тем же или
5 разными путями введения, но их можно вводить одновременно. Иммуностимулирующую композицию по изобретению и другой терапевтический агент вводят последовательно, когда введение иммуностимулирующей композиции по изобретению отделено по времени от введения другого
10 терапевтического агента. Разделение по времени между введением этих соединений может составлять минуты или может быть длиннее. В одном из воплощений иммуностимулирующую композицию по изобретению вводят перед введением другого терапевтического агента. В одном из воплощений иммуностимулирующую композицию по изобретению вводят после введения
15 другого терапевтического агента. Дополнительно, когда иммуностимулирующую композицию по изобретению и другой терапевтический агент вводят последовательно, тогда их можно вводить одним и тем же или разными путями введения. Другие терапевтические агенты включают адъюванты, антигены,
20 вакцины и лекарственные средства, полезные для лечения инфекции, рака, аллергии и астмы, но не ограничиваются этим.

В одном из аспектов изобретения предложен способ вакцинации субъекта. Способ в соответствии с этим аспектом изобретение включает стадию введения субъекту антигена и композиции по изобретению. В одном из воплощений введение антигена включает введение нуклеиновой кислоты,
30 кодирующей антиген.

Используемый в данной заявке "субъект" относится к позвоночному животному. В различных воплощениях субъект представляет собой человека, примата, отличного от человека, или другого млекопитающего. В некоторых
40 воплощениях субъект представляет собой мышь, крысу, морскую свинку, кролика, кошку, собаку, свинью, овцу, козу, корову или лошадь.

Для применения в вакцинации субъекта композиция по изобретению в одном из воплощений включает антиген. Антиген может быть отделен от полимера по изобретению или ковалентно связан с ним. В одном из воплощений композиция по изобретению сама не включает антиген. В этом
45 воплощении антиген может быть введен субъекту отдельно от композиции по
50

изобретению или вместе с композицией по изобретению. Введение, которое осуществляется отдельно, включает разделение по времени, разделение по расположению или пути введения, или разделение как по времени, так и по расположению или пути введения. Когда композицию по изобретению и антиген вводят отдельно по времени, тогда антиген может быть введен до или после композиции по изобретению. В одном из воплощений антиген вводят через 48 часов - 4 недели после введения композиции по изобретению. Способ также охватывает введение одной или более бустерных доз самого антигена, самой композиции или антигена и композиции после первоначального введения антигена и композиции.

Также в изобретении предполагается, что субъект может быть подготовлен к контакту с неизвестным антигеном в будущем путем введения субъекту композиции по изобретению, где композиция не включает антиген. В соответствии с этим воплощением иммунная система субъекта подготавливается к тому, чтобы сформировать более интенсивный ответ на антиген, с которым затем столкнется субъект, например, при воздействии факторов окружающей среды или воздействию, связанном с работой. Такой способ может быть использован, например, в отношении путешественников, медицинского персонала и солдат, которые, вероятно, столкнутся с микробными агентами.

В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего от инфекции. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от инфекции, эффективного количества композиции по изобретению и противоинфекционного лекарственного средства для лечения указанного субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложено применение иммуностимулирующего полимера по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения инфекции у субъекта. В одном из аспектов изобретения предложена композиция, полезная для лечения инфекции. Композиция в соответствии с этим аспектом включает иммуностимулирующий полимер по изобретению и противоинфекционное лекарственное средство.

Термин “лечить”, используемый в данной заявке со ссылкой на субъекта, страдающего от заболевания или состояния, должен означать профилактику, ослабление интенсивности симптомов или устранение по меньшей мере одного симптома заболевания или состояния у субъекта.

Субъект, страдающий от инфекционного заболевания, представляет собой субъекта, страдающего от расстройства, возникающего в результате поверхностной, локальной или системной инвазии субъекта инфекционным микроорганизмом. Инфекционный микроорганизм может представлять собой вирус, бактерию, гриб или паразит, как описано выше.

Противоинфекционные лекарственные средства включают антибактериальные агенты, противовирусные агенты, противогрибковые агенты и противопаразитарные агенты. Такие фразы, как “противоинфекционный агент”, “антибиотик”, “антибактериальный агент”, “противовирусный агент”, “противогрибковый агент”, “противопаразитарный агент” и “паразитоцид” имеют значения, хорошо известные специалисту в данной области техники и определенные в стандартной медицинской литературе. Кратко, антибактериальные агенты убивают или ингибируют бактерии и включают антибиотики, а также другие синтетические или природные соединения, обладающие аналогичными функциями. Противовирусные агенты могут быть выделены из природных источников или синтезированы и могут быть полезны для уничтожения или ингибирования вирусов. Противогрибковые агенты используют для лечения поверхностных грибковых инфекций, а также условно-патогенных и первичных системных грибковых инфекций. Противопаразитарные агенты убивают или ингибируют паразиты. Множество антибиотиков представляют собой низкомолекулярные молекулы, продуцируемые в виде вторичных метаболитов такими клетками, как микроорганизмы. В общих чертах, антибиотики ингибируют одну или более функций или структур, которые являются специфичными для данного микроорганизма и которые отсутствуют в клетках-хозяевах.

Одна из проблем, связанных с применением противоинфекционной терапии, представляет собой побочные эффекты, возникающие у хозяина, которого лечат противоинфекционным агентом. Например, многие противоинфекционные агенты могут убивать или ингибировать широкий спектр

микроорганизмов, и они не являются специфическими в отношении конкретного типа видов. Лечение такими типами противомикробных агентов приводит к уничтожению нормальной микробной флоры, присутствующей у хозяина, а также инфекционного микроорганизма. Утрата микробной флоры может приводить к осложнениям заболевания и появлению у хозяина предрасположенности к инфицированию другими патогенами, поскольку микробная флора конкурирует с инфекционными патогенами и, тем самым, служит защитным барьером от инфекционных патогенов. Другие побочные эффекты могут возникать в результате специфического или неспецифического воздействия таких химических веществ на немикробные клетки или ткани хозяина.

Другая проблема, связанная с широким применением противомикробных средств, заключается в возникновении устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов. Уже появились энтерококки, устойчивые к ванкомицину; пневмококки, устойчивые к пенициллину; *S. aureus* с множественной устойчивостью и штаммы *tuberculosis* с множественной устойчивостью, ставшие серьезной клинической проблемой. Широкое применение противомикробных средств, вероятно, приводит к получению многих устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. В результате для борьбы с указанными микроорганизмами необходимо разработать новые стратегии противомикробной терапии.

Антибактериальные антибиотики, которые являются эффективными для уничтожения или подавления широкого спектра бактерий, называются антибиотиками широкого спектра действия. Другие типы антибактериальных антибиотиков преимущественно эффективны против бактерий, относящихся к классу грамположительных или грамотрицательных бактерий. Эти типы антибиотиков названы антибиотиками узкого спектра действия. Другие антибиотики, которые являются эффективными против одного микроорганизма или заболевания, но не действуют против бактерий других типов, называются антибиотиками ограниченного спектра действия.

Антибактериальные агенты иногда классифицируются на основе их основного механизма действия. В общем, антибактериальные агенты представляют собой ингибиторы синтеза клеточной стенки, ингибиторы синтеза

клеточной мембраны, ингибиторы синтеза белка, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот или функциональные ингибиторы, и конкурентные ингибиторы. Ингибиторы синтеза клеточной стенки ингибируют стадию в процессе синтеза клеточной стенки, а, в общем, синтеза бактериального пептидогликана. Ингибиторы синтеза клеточной стенки включают β -лактамные антибиотики, природные пенициллины, полусинтетические пенициллины, ампициллин, клавулановую кислоту, цефалоспорины и бацитрацин.

β -Лактамы представляют собой антибиотики, содержащие четырехчленное β -лактамное кольцо, которое ингибирует последнюю стадию синтеза пептидогликанов. β -Лактамные антибиотики могут быть синтезированными или природными. β -Лактамные антибиотики, продуцируемые *penicillium*, представляют собой природные пенициллины, такие как пенициллин G или пенициллин V. Они продуцируются путем ферментации *Penicillium chrysogenum*. Природные пенициллины имеют узкий спектр активности и, как правило, они эффективны против *Streptococcus*, *Gonococcus* и *Staphylococcus*. Другие типы природных пенициллинов, которые также эффективны против грамположительных бактерий, включают пенициллины F, X, K и O.

Полусинтетические пенициллины, как правило, представляют собой модификации молекулы 6-аминопенициллановой кислоты, продуцируемой плесенью. 6-Аминопенициллановая кислота может быть модифицирована путем добавления боковых цепей, продуцирующих пенициллины, обладающие более широкими спектрами активности, чем природные пенициллины, или различными другими предпочтительными свойствами. Некоторые типы полусинтетических пенициллинов имеют широкие спектры действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий, но они инактивируются пенициллиназой. Эти полусинтетические пенициллины включают ампициллин, карбенициллин, оксациллин, азлоциллин, мезлоциллин и пиперациллин. Полусинтетические пенициллины других типов обладают более узким спектром активности, направленного против грамположительных бактерий, однако они обладают улучшенными свойствами, т.е. они не инактивируются пенициллиназой. Эти антибиотики включают, например, метициллин, диклоксациллин и нафциллин. Некоторые полусинтетические пенициллины широкого спектра действия могут быть использованы в комбинации с

ингибиторами β -лактамазы, такими как clavulanic кислоты и sulbactam. Ингибиторы β -лактамазы не обладают противомикробным действием, но они ингибируют пенициллиназу, обеспечивая тем самым защиту полусинтетического пенициллина от деградации.

Другим типом β -лактамных антибиотиков являются цефалоспорины. Такие антибиотики чувствительны к деградации под действием бактериальных β -лактамаз, и, таким образом, сами по себе не всегда эффективны. Тем не менее, цефалоспорины устойчивы к пенициллиназе. Они эффективны против различных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Цефалоспорины включают цефалотин, цефепим, цефалексин, цефамандол, цефаклор, цефазолин, цефуроксим, цефокситин, цефотаксим, цефсулодин, цефетамет, цефиксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидин и моксалактам, но не ограничиваются этим.

Бацитрацин представляет собой антибиотик другого класса, который ингибирует синтез клеточной стенки посредством ингибирования высвобождения муропептидных субъединиц или пептидогликана из молекулы, доставляющей данную субъединицу во внешнее пространство мембраны. Хотя бацитрацин является эффективным против грамположительных бактерий, его применение ограничено местным применением ввиду его высокой токсичности.

Карбапенемы представляют собой другие β -лактамные антибиотики широкого спектра действия, которые способны ингибировать синтез клеточной стенки. Примеры карбапенемов включают имипенемы, но не ограничиваются этим. Монобактамы также представляют собой β -лактамные антибиотики широкого спектра и включают азтреонам. Антибиотик, продуцируемый *Streptomyces*, ванкомицин, также является эффективным против грамположительных бактерий благодаря ингибированию синтеза клеточных мембран.

Другим классом антибактериальных агентов являются антибактериальные агенты, которые представляют собой ингибиторы синтеза клеточной мембраны. Эти соединения разрушают структуру бактериальных мембран или ингибируют их функцию. Одна из проблем, связанных с применением антибактериальных средств, которые представляют собой ингибиторы клеточных мембран, заключается в том, что из-за сходства

фосфолипидов бактериальной и эукариотической мембран они могут
воздействовать как на бактерии, так и на эукариотические клетки. Таким
образом, указанные соединения редко обладают достаточной специфичностью,
5 которая позволяла бы их использовать для системного введения и избежать
применения высоких доз этого соединения для местного введения.

Одним из используемых в медицине ингибиторов клеточных мембран
10 является полимиксин. Полимиксины нарушают функцию мембран посредством
связывания с мембранными фосфолипидами. Полимиксин эффективен,
главным образом, против грамотрицательных бактерий, и, в основном, он
15 используется для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, вызываемых
Pseudomonas, или инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями
Pseudomonas, которые являются устойчивыми к менее токсичным
антибиотикам. Серьезные побочные эффекты, ассоциированные с системным
20 введением этого соединения, включают поражение почек и других органов.

Другие ингибиторы клеточных мембран включают амфотерицин В и
нистатин, которые представляют собой противогрибковые агенты,
25 используемые, главным образом, для лечения системных грибковых инфекций
и инфекций, вызываемых дрожжами *Candida*. Антибиотиками других классов,
которые представляют собой ингибиторы клеточных мембран, являются
30 имидазолы. Имидазолы используются в качестве антибактериальных, а также
противогрибковых агентов, например, для лечения дрожжевых, дерматофитных
инфекций и системных грибковых инфекций. Имидазолы включают
35 клотримазол, миконазол, кетоконазол, итраконазол и флуконазол, но не
ограничиваются этим.

Многие антибактериальные агенты представляют собой ингибиторы
40 синтеза белков. Эти соединения предотвращают синтез бактериальных
структурных белков и ферментов и таким образом приводят к ингибированию
роста или функционирования бактериальной клетки или гибели клеток. Обычно
эти соединения блокируют процессы транскрипции или трансляции.
45 Антибактериальные агенты, блокирующие транскрипцию, включают рифампины
и этамбутол, но не ограничиваются этим. Рифампины, ингибирующие фермент
РНК-полимеразу, обладают широким спектром активности и эффективны
50 против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также против

Mycobacterium tuberculosis. Этамбутол является эффективным против *Mycobacterium tuberculosis*.

Антибактериальные средства, которые блокируют трансляцию, препятствуют трансляции мРНК с бактериальных рибосом в белки. В основном, этот класс соединений включает тетрациклины, хлорамфеникол, макролиды (например эритромицин) и аминогликозиды (например стрептомицин), но не ограничивается этим.

Аминогликозиды представляют собой класс антибиотиков, продуцируемых бактериями *Streptomyces*, например, таких как стрептомицин, канамицин, тобрамицин, амикацин и гентамицин. Аминогликозиды используют против широкого спектра бактериальных инфекций, вызываемых грамположительными и грамотрицательными бактериями. Стрептомицин широко используют в качестве основного лекарства для лечения туберкулеза. Гентамицин используют для лечения инфекций, вызываемых многими штаммами грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *Pseudomonas*, особенно в комбинации с тобрамицином. Канамицин используют против многих грамположительных бактерий, включая устойчивые к пенициллину *Staphylococci*. Показано, что при длительном введении аминогликозидов в дозах, при которых они являются наиболее эффективными, одним из побочных эффектов аминогликозидов, который ограничивает его клиническое применение, является нарушение функции почек и повреждение слухового нерва, приводящее к глухоте.

Другим типом антибактериальных агентов, ингибирующих трансляцию, являются тетрациклины. Тетрациклины представляют собой класс антибиотиков широкого спектра действия, эффективных против различных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Примеры тетрациклинов включают тетрациклин, миноциклин, доксициклин и хлортетрациклин. Эти антибиотики важны для лечения множества типов бактерий, но особенно важны в лечении болезни Лайма. Вследствие низкой токсичности и минимальных прямых побочных эффектов тетрациклинов, этими антибиотиками злоупотребляют и неправильно используют в медицинском сообществе, что приводит к серьезным проблемам. Например, чрезмерное употребление этих антибиотиков приводит к широко распространенному развитию устойчивости.

Антибактериальные агенты, такие как макролиды, обратимо связываются с рибосомной субъединицей 50S и ингибируют элонгацию белка пептидилтрансферазой или предотвращают высвобождение незаряженной тРНК из бактериальной рибосомы, или и то и другое. Эти соединения включают эритромицин, рокситромицин, кларитромицин, олеандомицин и азитромицин. Эритромицин обладает активностью против большинства грамположительных бактерий, *Neisseria*, *Legionella* и *Haemophilus*, но не против *Enterobacteriaceae*. Линкомицин и клиндамицин, которые блокируют образование пептидных связей в процессе синтеза белка, используют против грамположительных бактерий.

Другой тип ингибиторов трансляции представляет собой хлорамфеникол. Хлорамфеникол связывается с 70S рибосомой, ингибируя бактериальный фермент пептидилтрансферазу и тем самым предотвращая рост полипептидной цепи в процессе синтеза белка. Одним из серьезных побочных эффектов, ассоциированных с хлорамфениколом, является апластическая анемия. Апластическая анемия развивается при дозах хлорамфеникола, которые эффективны для лечения бактериальных инфекций у небольшой части пациентов (1/50000). В настоящее время хлорамфеникол, который раньше был наиболее используемым антибиотиком, используется редко из-за случаев смерти от анемии. Но поскольку этот антибиотик является достаточно эффективным, он все же используется в опасных для жизни ситуациях (например при брюшном тифе).

Некоторые антибактериальные агенты нарушают синтез или функцию нуклеиновых кислот, например, связываются с ДНК или РНК, что приводит к невозможности считывания их транскриптов. Эти агенты включают хинолоны и котримоксазол, которые оба являются синтетическими химическими соединениями, и рифамицины, которые являются природными или полусинтетическими химическими соединениями, но не ограничиваются этим. Хинолоны блокируют репликацию бактериальной ДНК посредством ингибирования ДНК-гиразы, т.е. фермента, необходимого для продуцирования бактериями их собственной кольцевой ДНК. Хинолины имеют широкий спектр, и примеры включают норфлоксацин, ципрофлоксацин, эноксацин, налидиксовую кислоту и темафлоксацин. Налидиксовая кислота представляет собой бактерицидный агент, который связывается с ферментом ДНК-гиразой

(топоизомеразой), который важен для репликации ДНК и позволяет суперспиралям стабилизироваться и восстанавливаться, ингибируя ДНК-гиразную активность. Основное применение налидиксовой кислоты состоит в
5 лечении инфекций нижних мочевыводящих путей (НМП) вследствие ее эффективности против некоторых типов грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* и *Proteus sp.*, которые являются
10 основными возбудителями НМП. Котримоксазол представляет собой комбинацию сульфаметоксазола и триметроприма и блокирует бактериальный синтез фолиевой кислоты, необходимой для образования нуклеотидов ДНК. Рифампицин представляет собой производное рифамицина, которое обладает
15 активностью против грамположительных бактерий (включая *Mycobacterium tuberculosis* и *Neisseria meningitidis*, вызывающую менингит) и против некоторых грамотрицательных бактерий. Рифампицин связывается с бета-субъединицей
20 полимеразы и блокирует присоединение первого нуклеотида, который необходим для активации полимеразы, блокирует тем самым синтез мРНК.

Другим классом антибактериальных агентов являются соединения,
25 которые действуют как конкурентные ингибиторы бактериальных ферментов. Почти все конкурентные ингибиторы имеют структурное сходство с бактериальным фактором роста и конкурируют за связывание с ним, но при
30 этом они не осуществляют метаболических функций в клетке. Эти соединения включают сульфонамиды и химически модифицированные формы сульфаниламидов, которые обладают даже более высокой и более широкой
35 антибактериальной активностью. Сульфонамиды (например гантризин и триметоприм) полезны для лечения инфекций, вызываемых *Streptococcus pneumoniae*, бета-гемолитическими стрептококками и *E.coli*, и используются в
40 лечении неосложненных инфекций НМП, вызываемых *E.coli*, и в лечении менингококкового менингита.

Противовирусные агенты представляют собой соединения, предотвращающие инфицирование клеток вирусами или репликацию вируса в
45 клетке. Противовирусных лекарств существует гораздо меньше, чем антибактериальных лекарств, поскольку процесс репликации вируса настолько тесно связан с репликацией ДНК в клетке-хозяине, что неспецифические
50 противовирусные агенты часто являются токсичными для данного хозяина.

Процесс инфицирования вирусом протекает в несколько стадий, которые могут быть блокированы или ингибированы противовирусными агентами. Эти стадии включают присоединение вируса к клетке-хозяину (иммуноглобулин или связывающие пептиды), “раздевание” вируса (например амантадин), синтез или трансляция вирусной мРНК (например интерферон), репликацию вирусной РНК или ДНК (например нуклеозидные аналоги), созревание новых вирусных белков (например ингибиторы протеаз), а также “почкование” и высвобождение вируса.

Другая категория противовирусных агентов представляет собой нуклеозидные аналоги. Нуклеозидные аналоги представляют собой синтетические соединения, которые аналогичны нуклеозидам, но которые имеют неполную или аномальную дезоксирибозную или рибозную группу. После включения нуклеозидных аналогов в клетку, они фосфорилируются с образованием трифосфата, который конкурирует с нормальными нуклеотидами за включение в вирусную ДНК или РНК. После включения трифосфатной формы нуклеозидного аналога в растущую цепь нуклеиновой кислоты происходит необратимое связывание с вирусной полимеразой, в результате чего рост цепи прекращается. Нуклеозидные аналоги включают ацикловир (используемый для лечения заболевания, вызываемого вирусом простого герпеса и ветряной оспы), ганцикловир (полезный для лечения заболевания, вызываемого цитомегаловирусом), идоксуридин, рибавирин (полезный для лечения заболевания, вызываемого респираторно-синцитиальным вирусом), дидезоксиинозин, дидезоксицитидин и зидовудин (азидотимидин), но не ограничиваются этим.

Другой класс противовирусных агентов включает цитокины, такие как интерфероны. Интерфероны представляют собой цитокины, которые секретируются вирус-инфицированными клетками, а также иммунными клетками. Интерфероны функционируют посредством связывания со специфическими рецепторами на клетках, расположенных по соседству с инфицированными клетками, что приводит к изменениям в клетках, которые обеспечивают их защиту от инфицирования вирусом. α - и β -Интерфероны также индуцируют экспрессию молекул МНС класса I и класса II на поверхности инфицированных клеток, что приводит к повышению уровня презентации антигена для его распознавания иммунными клетками хозяина. α - и β -

Интерфероны доступны в рекомбинантных формах и использовались для лечения хронического инфекционного гепатита В и С. Но в дозах, эффективных для противовирусной терапии, интерфероны приводят к серьезным побочным эффектам, таким как лихорадка, недомогание и потеря массы организма.

Иммуноглобулиновую терапию используют для предупреждения вирусной инфекции. Иммуноглобулиновая терапия, используемая для борьбы с вирусными инфекциями, отличается от антибактериальной терапии тем, что она не является антигенспецифической и действует путем связывания с внеклеточными вирионами и тем самым предупреждает присоединение и проникновение в клетки, которые восприимчивы к вирусной инфекции. Такую терапию используют для предупреждения вирусной инфекции в такой период времени, когда в организме хозяина присутствуют антитела. В основном, существуют два типа иммуноглобулиновой терапии, нормальная иммуноглобулиновая терапия и гипериммуноглобулиновая терапия. При нормальной иммуноглобулиновой терапии используют антительный продукт, который получают из сыворотки крови здоровых доноров и собирают. Этот собранный продукт содержит низкие титры антитела против широкого ряда человеческих вирусов, таких как вирус гепатита А, парвовирус, энтеровирус (особенно у новорожденных). При гипериммуноглобулиновой терапии используют антитела, которые получают из сыворотки индивидуумов, имеющих высокие титры антитела против конкретного вируса. Эти антитела затем используют против конкретного вируса. Примеры гипериммуноглобулинов включают иммуноглобулин против вируса опоясывающего герпеса (используемый для предупреждения ветряной оспы у детей и новорожденных с ослабленной иммунной системой), иммуноглобулин против бешенства человека (используемый в качестве профилактической меры после укуса субъекта бешеным животным), иммуноглобулин против гепатита В (используемый для предупреждения гепатита В, особенно у пациентов, подвергавшихся контакту с вирусом) и иммуноглобулин против RSV (полезный для лечения инфекций, вызываемых респираторно-синцитиальным вирусом).

Противогрибковые агенты полезны для лечения и предупреждения инфекций, вызываемых грибами. Противогрибковые агенты иногда классифицируются по механизму их действия. Некоторые противогрибковые

агенты функционируют как ингибиторы синтеза клеточной стенки посредством ингибирования глюкозосинтазы. Эти агенты включают базифунгин/ЕСВ, но не ограничиваются этим. Другие противогрибковые агенты функционируют посредством дестабилизации целостности мембраны. Такие агенты включают имидазолы, такие как клотримазол, сертаконазол, флуконазол, итраконазол, кетоконазол, миконазол и вориконазол, а также FK 463, амфотерицин В, ВАУ 38-9502, МК 991, прадиимидин, UK 292, бутенафин и тербинафин, но не ограничиваются этим. Другие противогрибковые агенты функционируют посредством разрушения хитина (например хитиназы) или иммуносупрессии (крем 501).

Противопаразитарные агенты представляют собой агенты, которые непосредственно убивают паразитов. Такие соединения известны в данной области техники и, как правило, имеются в продаже. Примеры противопаразитарных агентов, полезных для введения человеку, включают альбендазол, амфотерицин В, бензнидазол, битионил, хлорохин-НСI, хлорохина фосфат, клиндамицин, дегидроэметин, диэтилкарбамазин, дилоксанида фуруат, эфлорнитин, фуразолидон, глюкокортикоиды, галофантрин, йодохинол, ивермектин, мебендазол, мефлохин, меглумина антимионат, меларсопрол, метрифонат, метронидазол, никлозамид, нифуртимокс, оксаминин, паромомицин, пентамидина изетионат, пиперазин, празиквантел, примахина фосфат, прогуанил, пирантела памоат, пириметанмин-сульфонамиды, пириметанмин-сульфадоксин, хинакрин-НСI, хинина сульфат, хинидина глюконат, спирамицин, стибоглюконат натрия (глюконат натрия-сурьмы), сурамин, тетрациклин, доксициклин, тиабендазол, тинидазол, триметроприм-сульфаметоксазол и трипарсамид, но не ограничиваются этим.

Полимеры также полезны для подавления Th2-подобного иммунного ответа у субъекта. Иммунный ответ Th2-типа характеризуется по меньшей мере частично Th2-цитокинами IL-4 и IL-5, а также переключением изотипа антител на IgE. Таким образом, подавление Th2-подобного ответа относится к уменьшению продукции Th2-цитокинов и другим Th2 эффектам. Полимеры также могут быть использованы для индукции Th1-подобного иммунного ответа. Th1- и Th2-иммунные ответы имеют взаимно противоположную регуляцию, так

что смещение иммунного ответа в сторону иммунного ответа Th1-типа может предотвращать или ослаблять иммунный ответ Th2-типа.

Полимеры также могут быть использованы для лечения и предупреждения аутоиммунного заболевания. Аутоиммунное заболевание представляет собой класс заболеваний, при которых собственные антитела субъекта реагируют с тканями хозяина, или при которых эффекторные Т-клетки иммунной системы являются аутореактивными в отношении эндогенных аутопептидов и вызывают разрушение ткани. Таким образом, возникает иммунный ответ против собственных антигенов субъекта, названных аутоантигенами. Аутоиммунные заболевания включают ревматоидный артрит, болезнь Крона, рассеянный склероз, системную красную волчанку (SLE), аутоиммунный энцефаломиелит, тяжелую миастению (MG), зоб Хасимото, синдром Гудпасчера, пузырчатку (например пузырчатку обыкновенную), болезнь Грейвса, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, склеродермию с антителами против коллагена, смешанной заболевание соединительной ткани, полимиозит, пернициозную анемию, идиопатическую болезнь Аддисона, аутоиммунное бесплодие, гломерулонефрит (например серповидный гломерулонефрит, пролиферативный гломерулонефрит), буллезный пемфигоид, синдром Шегрена, инсулинорезистентность и аутоиммунный сахарный диабет, но не ограничиваются этим.

Аутоантиген относится к антигену нормальной ткани хозяина. Нормальная ткань хозяина не включает раковые клетки. Таким образом, иммунный ответ, возникающий против аутоантигена в контексте аутоиммунного заболевания, представляет собой нежелательный иммунный ответ и вносит вклад в деструкцию и поражение нормальной ткани, тогда как иммунный ответ, возникающий против ракового антигена, представляет собой желательный иммунный ответ и вносит вклад в деструкцию опухоли или рака. Таким образом, в некоторых аспектах изобретения, нацеленных на лечение аутоиммунных расстройств, не рекомендуется, чтобы полимер вводили с аутоантигенами, в особенности такими антигенами, которые являются мишенями для аутоиммунного расстройства.

В других случаях полимер может доставляться с низкими дозами аутоантигенов. Для ряда животных продемонстрировано, что введение через слизистые оболочки низких доз антигена может привести в результате к состоянию иммунной гипореактивности или "толерантности". Активный механизм, по-видимому, представляет собой цитокин-опосредованное иммунное отклонение от Th1- в направлении преимущественно Th2- и Th3- (т.е. преимущественно TGF- β) ответа. Активное подавление путем доставки малых доз антигена также может подавлять не связанный с ним иммунный ответ (побочное подавление), что представляет особый интерес в терапии аутоиммунных заболеваний, например ревматоидного артрита и SLE (системной красной волчанки). Побочное подавление вовлекает секрецию Th1-антагонист-регулируемых, супрессорных цитокинов в локальное окружение, где провоспалительные и Th1-цитокины высвобождаются антиген-специфическим или антиген-неспецифическим образом. Используемый в данной заявке термин "толерантность" относится к этому явлению. Действительно, пероральная толерантность эффективна в лечении множества аутоиммунных заболеваний у животных, включающих: экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE), экспериментальную аутоиммунную тяжелую миастению, коллаген-индуцированный артрит (CIA) и инсулинзависимый сахарный диабет. В этих моделях предупреждение и подавление аутоиммунного заболевания ассоциируется со сдвигом антигенспецифического гуморального и клеточного ответов от Th1- к Th2/Th3-ответу.

Композиции и способы по изобретению могут быть использованы самостоятельно или в сочетании с другими агентами и способами, полезными для лечения рака. В одном из аспектов в изобретении предложен способ лечения субъекта, страдающего от рака. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от рака, эффективного количества композиции по изобретению для лечения указанного субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего от рака. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от рака, эффективного

количества композиции по изобретению и противоопухолевой терапии для лечения указанного субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложено применение иммуностимулирующего полимера по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложена композиция, полезная для лечения рака. Композиция в соответствии с этим аспектом включает иммуностимулирующий полимер по изобретению и противораковое лекарственное средство.

Субъектом, страдающим от рака, является субъект, у которого имеются детектируемые раковые клетки. Рак может представлять собой злокачественный или незлокачественный рак. Используемый в данной заявке термин "рак" означает неконтролируемый рост клеток, препятствующий нормальному функционированию органов и систем организма. Злокачественные опухоли, которые мигрируют из их первоначального местонахождения и заселяют жизненно важные органы, могут в конечном счете привести к смерти субъекта в результате нарушения функций пораженных органов. Злокачественные опухоли кроветворных органов, такие как лейкоз, способны вытеснять нормальные кроветворные компартменты у субъекта, таким образом приводя к расстройству кроветворения (в форме анемии, тромбоцитопении и нейтропении) и в конечном счете к летальному исходу.

Метастаз представляет собой область раковых клеток, отличную от первичной опухолевой локализации, являющуюся результатом диссеминации раковых клеток из первичной опухоли в другие участки организма. При диагностике первичной опухоли субъект может быть обследован на наличие метастазов. Помимо выявления характерных симптомов метастазы чаще всего обнаруживаются с помощью отдельных или комбинированных методов сканирования посредством магнитно-резонансной томографии (MRI), компьютерной томографии (СТ), подсчета формульных элементов крови и числа тромбоцитов, исследований функции печени, флюорографии грудной клетки и сканирования костей.

Раковые заболевания включают базально-клеточную карциному; рак желчных протоков; рак мочевого пузыря; рак кости; рак головного мозга и

центральной нервной системы (ЦНС); рак молочной железы; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой и прямой кишки; рак соединительных тканей; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаз; рак головы и шеи; внутриэпителиальное новообразование; рак почки; рак гортани; лейкоз; рак печени; рак легких (например мелкоклеточный и немелкоклеточный рак); лимфому, включая лимфому Ходжкина и лимфому не-Ходжкина; меланому; миелому; нейробластому; рак полости рта (например рак губы, языка, рта и глотки); рак яичника; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак дыхательных путей; саркому; рак кожи; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; рак матки; рак мочевых путей, а также другие карциномы, аденокарциномы и саркомы, но не ограничиваются этим.

Иммуностимулирующую композицию по изобретению также можно вводить в сочетании с противораковой терапией. Противораковая терапия включает противораковые лекарственные средства, облучение и хирургические процедуры. Используемый в данной заявке термин "противораковое лекарственное средство" относится к агенту, который вводят субъекту для лечения рака. Как используется в данной заявке, "лечение рака" включает предупреждение развития рака, уменьшение симптомов рака и/или ингибирование роста установленного рака. В других аспектах противораковое лекарственное средство вводят субъекту, имеющему риск развития рака, с целью уменьшения риска развития рака. В данной заявке описаны различные типы лекарственных средств для лечения рака. Для задачи данного описания противораковые лекарственные средства классифицируют как химиотерапевтические агенты, иммунотерапевтические агенты, противораковые вакцины, гормонотерапию и модификаторы биологического ответа.

Химиотерапевтические агенты могут быть выбраны из группы, состоящей из метотрексана, винкристина, адриамицина, цисплатина, не содержащих сахара хлорэтилнитрозомочевин, 5-фторурацила, митомицина С, блеомицина, доксорубина, дакарбазина, таксола, фрагилина, мегламина GLA, валрубина, кармустина и полиферпосана, MMI270, BAY 12-9566, ингибитора фарнезилтрансферазы RAS, ингибитора фарнезилтрансферазы, MMP,

МТА/LY231514, LY264618/лометексола, гламолека, CI-994, TNP-470,
 гикамтина/топотекана, PKC412, валсподара/PSC833,
 новантрона/митроксантрона, метарета/сурамина, батимастата, E7070, BCH-
 4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, инцела/УХ-710, VX-853, ZD0101, ISI641,
 ODN 698, TA 2516/мармистата, BB2516/мармистата, CDP 845, D2163,
 PD183805, DX8951f, лемонала DP 2202, FK 317, пицибанила/OK-432, AD
 32/валрубицина, метастрона/производного стронция, темодала/темозоломида,
 эвацета/липосомального доксорубицина, ютаксана/паклитаксела,
 таксола/паклитаксела, кселоада/капецитабина, фуртулона/доксифлуридина,
 циклопакса/перорального паклитаксела, перорального таксоида, SPU-
 077/цисплатина, HMR 1275/флавопиридола, CP-358(774)/EGFR, CP-
 609(754)/ингибитора онкогена RAS, BMS-182751/пероральной платины,
 UFT(тегафура/урацила), эргамизола/левамизола,
 энилурацила/776C85/энхансера 5FU, кампто/левамизола,
 камптосара/иринотекана, тумодекса/ралитрекседа, леустатина/кладрибина,
 паксекса/паклитаксела, доксила/липосомального доксорубицина,
 целикса/липосомального доксорубицина, флудара/флударабина,
 фармарубицина/эпирубицина, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/бис-нафталимида,
 LU 103793/доластаина, цетикса/липосомального доксорубицина,
 гемзара/гемцитабина, ZD 0473/анормеда, YM 116, затравочных кристаллов
 йода, ингибиторов CDK4 и CDK2, ингибиторов PARP, D4809/дексифосамида,
 ифеса/меснекса/ифосфамида, вумона/тенипозид, параплатина/карбоплатина,
 плантинола/цисплатина, вепезида/зтопозид, ZD 9331, таксотера/доцетаксела,
 пролекарства гуанинарабинозида, аналога таксана, нитрозомочевин,
 алкилирующих агентов, таких как мелфелан и циклофосфамид,
 аминоклутетимида, аспарагиназы, бусульфана, карбоплатина, хлоромбуцила,
 цитарабина HCl, дактиномицина, даунорубицина HCl, эстрамустина фосфата
 натрия, этопозид (VP16-213), флоксуридина, фторурацила (5-FU), флутамида,
 гидроксимочевины (гидроксикарбамида), ифосфамида, интерферона-альфа-2а,
 альфа-2b, лейпролида ацетата (аналога LHRH-высвобождающего фактора),
 ломустина (CCNU), мехлоретамин HCl (азотистого иприта), меркаптопурина,
 месны, митотана (о.р'-DDD), митоксантрона HCl, октреотида, пликамицина,
 прокарбазина HCl, стрептозоцина, тамоксифена цитрата, тиогуанина, тиотепы,

винбластина сульфата, амсакрина (m-AMSA), азацитидина, эртропозтина, гексаметилмеламина (HMM), интерлейкина 2, митогуазона (метил-GAG; метилглиоксаля бис-гуанилгидразона; MGBG), пентостатина (2'-
 5 дезоксикоформицина), семустина (метил-CCNU), тенипозид (VM-26) и виндезина сульфата, но не ограничивающейся этим.

Иммунотерапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей
 10 из 3622W94, 4B5, ANA Ab, анти-FLK-2, анти-VEGF, ATRAGEN, AVASTIN (бевацизумаба; Genentech), BABS, BEC2, BEXXAR (тозитумомаба; GlaxoSmithKline), C225, CAMPATH (алемтузумаба; Genzyme Corp.), CEACIDE,
 15 CMA 676, EMD-72000, ERBITUX (цетуксимаба; ImClone Systems, Inc.), Gliomab-H, GNI-250, HERCEPTIN (трастузумаба; Genentech), IDEC-Y2B8, ImmuRAIT-CEA, ior c5, ior egf.r3, ior t6, LDP-03, LymphoCide, MDX-11, MDX-22, MDX-210, MDX-220, MDX-260, MDX-447, MELIMMUNE-I, MELIMMUNE-2, Монофарм-С,
 20 NovoMAb-G2, онколима, OV103, оварекса, панорекса, претаргета, квадрамета, рибутаксина, ритуксана (ритуксимаба; Genentech), SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab, SMART M195, TNT и ZENAPAX (даклизумаба; Roche), но не
 25 ограничивающихся этим.

Противораковая вакцина может быть выбрана из группы, состоящей из EGF, антиидиотипических противораковых вакцин, антигена Gp75, вакцины
 30 против меланомы GMK, вакцины на основе конъюгата "MGV-ганглиозид", Her2/neu, оварекса, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL-тератопы, BLP25 (MUC-1), липосомной идиотипической вакцины, мелацина, вакцин на основе пептидных антигенов, вакцин на основе токсина/антигена, вакцины на основе MVA, PACIS,
 35 вакцины на основе BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-вируса, ImmuCyst/TheraCys, но не ограничивающихся этим.

Композиции и способы по изобретению могут быть использованы
 40 самостоятельно или в сочетании с другими агентами и способами, полезными для лечения аллергии. В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего от аллергического состояния. Способ в
 45 соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от аллергического состояния, эффективного количества композиции по изобретению для лечения указанного субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего от аллергического состояния. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от

5 аллергического состояния, эффективного количества композиции по изобретению и противоаллергической терапии для лечения указанного субъекта.

10 В одном из аспектов изобретения предложено применение иммуностимулирующего полимера по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения аллергического состояния у субъекта.

15 В одном из аспектов изобретения предложена композиция, полезная для лечения аллергического состояния. Композиция в соответствии с этим аспектом включает иммуностимулирующий полимер по изобретению и противоаллергическое лекарственное средство.

20 “Субъект, страдающий от аллергического состояния” должен относиться к субъекту, который в настоящее время испытывает или ранее испытывал аллергическую реакцию в ответ на аллерген. Термины “аллергическое

25 состояние” или “аллергия” означают приобретенную гиперчувствительность к какому-либо веществу (аллергену). Аллергические состояния включают экзему, аллергический ринит или острый ринит, сенную лихорадку, аллергический

30 конъюнктивит, бронхиальную астму, крапивницу (сыпи) и пищевые аллергии; другие атопические состояния, включающие атопический дерматит; анафилаксию; аллергию, вызванную лекарственными средствами; и ангиоздему, но не ограничиваются этим.

35 Аллергия обычно представляет собой эпизодическое состояние, ассоциированное с продукцией антител конкретного класса иммуноглобулина IgE против аллергенов. Развитие IgE-опосредованного ответа на наиболее

40 распространенные аэроаллергены также является фактором, указывающим на предрасположенность к развитию астмы. Если аллерген взаимодействует со специфическим IgE, связанным с Fc-рецептором IgE (FcεR) на поверхности

45 базофилов (циркулирующих в крови) или тучных клеток (распределенных по всей твердой ткани), то такая клетка становится активной, что приводит к продуцированию и высвобождению медиаторов, таких как гистамин, серотонин

50 и липидные медиаторы.

Аллергическая реакция наблюдается в том случае, когда тканеспецифический иммуноглобулин IgE типа реагирует с чужеродным аллергеном. Антитело IgE связывается с тучными клетками и/или с базофилами, и такие специализированные клетки высвобождают химические медиаторы (вазоактивные амины) аллергической реакции после их стимуляции аллергенами, присоединенными к концам молекулы антитела. Наиболее известными медиаторами аллергических реакций у человека являются гистамин, фактор активации тромбоцитов, метаболиты арахидоновой кислоты и серотонин. Гистамин и другие вазоактивные амины обычно находятся в тучных клетках и базофильных лейкоцитах. Тучные клетки распределены по всем тканям животного, а базофилы циркулируют в сосудистой системе. Эти клетки вырабатывают и накапливают гистамин в клетке до тех пор, пока не будет запущена определенная цепь событий, включающих связывание с IgE, для высвобождения гистамина.

Симптомы аллергической реакции варьируются в зависимости от ее местонахождения в организме, где IgE реагирует с антигеном. Если указанная реакция происходит в эпителии дыхательных путей, то обычно возникают такие симптомы, как чиханье, кашель и астматические реакции. Если такая реакция происходит в пищеварительном тракте, как в случае пищевых аллергий, то обычно возникают боли в брюшной полости и диарея. Системные аллергические реакции, например, после укуса пчелы или введения пенициллина субъекту с аллергией, могут быть тяжелыми часто опасными для жизни.

Аллергия ассоциируется с иммунным ответом Th2-типа, который характеризуется по меньшей мере частично Th2-цитокинами IL-4 и IL-5, а также переключением изотипа антитела на IgE. Иммуностимулирующие полимеры по изобретению сами по себе полезны для лечения субъекта, страдающего от аллергического состояния, поскольку иммуностимулирующие полимеры могут смещать иммунный ответ в сторону иммунного ответа Th1-типа. Альтернативно или в дополнение к этому, иммуностимулирующие полимеры по изобретению могут быть использованы в комбинации с аллергеном для лечения субъекта, страдающего от аллергического состояния.

Иммуностимулирующую композицию по изобретению также можно вводить в сочетании с противоаллергической терапией. Обычные способы лечения или предупреждения аллергии охватывают применение лекарственных средств против аллергии или десенсибилизирующей терапии. Некоторые развивающиеся способы лечения или предупреждения аллергии включают применение нейтрализующих анти-IgE антител. Антигистамины и другие лекарства, которые блокируют действие химических медиаторов аллергической реакции, способствуют регуляции тяжести аллергических симптомов, но не способны предотвращать аллергическую реакцию и не оказывают влияния на последующие аллергические ответы. Десенсибилизирующую терапию проводят с использованием малых доз аллергена, обычно путем его подкожной инъекции, с целью индукции ответа IgG-типа против этого аллергена. Полагают, что присутствие IgG антитела способствует нейтрализации продукции медиаторов в результате индукции антител IgE. Исходно, субъекта лечат очень низкой дозой данного аллергена, во избежание сильной реакции, и дозу медленно увеличивают. Терапия такого типа довольно опасна, поскольку субъекту фактически вводят соединения, которые вызывают у него аллергический ответ и могут привести к тяжелым аллергическим реакциям.

Противоаллергические лекарственные средства включают антигистаминные средства, кортикостероиды и индукторы простагландина, но не ограничиваются этим. Антигистаминные средства представляют собой соединения, которые противодействуют высвобождению гистамина тучными клетками или базофилами. Эти соединения хорошо известны в данной области техники и обычно используются для лечения аллергии. Антигистаминные средства включают акривастин, астемизол, азатадин, азеластин, бетатастин, бромфенирамин, буклизин, цетиризин, аналоги цетиризина, хлорфенирамин, клемастин, CS 560, ципрогептадин, деслоратадин, дексхлорфенирамин, эбастин, эпинастин, фексофенадин, HSR 609, гидроксизин, левокабастин, лоратидин, метскополамин, мизоластин, норастемизол, фениндамин, прометазин, пириламин, терфенадин и траниласт, но не ограничиваются этим.

Кортикостероиды включают метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, беклометазон, будезонид, дексаметазон, флунизолид, флутиказона пропионат и триамцинолон, но не ограничиваются этим. Хотя дексаметазон является

кортикостероидом, обладающим противовоспалительным действием, однако он обычно не используется для лечения аллергии или астмы в ингалируемой форме, поскольку он в высокой степени абсорбируется клетками и при эффективной дозе обладает длительными супрессорными побочными эффектами. Тем не менее, дексаметазон может быть использован в соответствии с изобретением для лечения аллергии или астмы, так как при введении в комбинации с композицией по изобретению он может быть введен в низкой дозе для уменьшения побочных эффектов. Некоторые из побочных эффектов, ассоциированных с применением кортикостероидов, включают кашель, дисфонию и молочницу (кандидоз ротовой полости), а при более высоких дозах системные эффекты, такие как подавление функции надпочечников, непереносимость глюкозы, остеопороз, асептический некроз кости, образование катаракты, подавление роста, гипертензия, мышечная слабость, истончение кожи и легкая кровоточивость. Barnes & Peterson (1993) *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: S1-S26; и Kamada A.K. et al. (1996) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153: 1739-48.

Композиции и способы по изобретению могут быть использованы самостоятельно или в сочетании с другими агентами и способами, полезными для лечения астмы. В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего от астмы. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от астмы, эффективного количества композиции по изобретению для лечения указанного субъекта. В одном из аспектов изобретения предложен способ лечения субъекта, страдающего от астмы. Способ в соответствии с этим аспектом изобретения включает стадию введения субъекту, страдающему от астмы, эффективного количества композиции по изобретению и противоастматической терапии для лечения указанного субъекта.

В одном из аспектов изобретения предложено применение иммуностимулирующего полимера по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения астмы у субъекта. В одном из аспектов изобретения предложена композиция, полезная для лечения астмы. Композиция в соответствии с этим аспектом включает иммуностимулирующий полимер по изобретению и противоастматическое лекарственное средство.

Используемый в данной заявке термин “астма” относится к расстройству респираторной системы, характеризующемуся воспалением и сужением дыхательных путей и увеличенной реактивностью дыхательных путей на вдыхаемые агенты. Астма часто, хотя не исключительно, ассоциируется с атопическим или аллергическим состоянием. Симптомы астмы включают повторяющиеся эпизоды стертормозного дыхания, одышки, сжатия в груди и кашель, являющийся результатом затрудненного дыхания. Воспаление дыхательных путей, сопровождающее астму, можно определить благодаря наблюдению за рядом физиологических изменений, таких как денудация эпителия дыхательных путей, отложение коллагена под базальной мембраной, отек, активация тучных клеток, инфильтрация воспалительных клеток, включающих нейтрофилы, эозинофилы и лимфоциты. В результате воспаления дыхательных путей у больных астмой часто наблюдается гиперреактивность дыхательных путей, затрудненное дыхание, респираторные симптомы и хронический характер болезни. Затрудненное дыхание включает острый бронхостеноз, отек дыхательных путей, образование слизистых пробок и ремоделирование дыхательных путей, признаки, которые часто приводят к бронхиальной обструкции. В некоторых случаях астмы может иметь место фиброз подбазальной мембраны, что приводит к устойчивому нарушению легочной функции.

Исследования последних нескольких лет показали, что астма, вероятно, является следствием комплексных взаимодействий между воспалительными клетками, медиаторами и другими клетками и тканями, присутствующими в дыхательных путях. Тучные клетки, эозинофилы, эпителиальные клетки, макрофаги и активированные Т-клетки играют важную роль в воспалительном процессе, ассоциированном с астмой. Djukanovic R. et al. (1990) *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 434-457. Полагают, что эти клетки могут нарушать функцию дыхательных путей в результате секреции уже образованных и вновь синтезированных медиаторов, которые могут прямо или опосредованно действовать на локальный участок ткани. Также известно, что субпопуляции Т-лимфоцитов (Th2) играют важную роль в регуляции аллергического воспаления в дыхательных путях посредством высвобождения селективных цитокинов и в

переходе данного заболевания в статус хронического заболевания. Robinson D.S. et al. (1992) *N. Engl. J. Med.* 326: 298-304.

Астма представляет собой комплексное расстройство, возникающее на различных стадиях развития организма, и может быть классифицирована по степени тяжести ее симптомов, например как острое, подострое или хроническое расстройство. Острый воспалительный ответ ассоциируется с ранним рекрутингом клеток в дыхательные пути. Подострый воспалительный ответ включает рекрутинг клеток, а также активацию резидентных клеток, приводящие к более устойчивому характеру воспаления. Хронический воспалительный ответ характеризуется персистентным поражением клеток и постоянным процессом репарации, которые могут приводить к развитию перманентной патологии дыхательных путей. "Субъект, страдающий от астмы" представляет собой субъекта, который страдает от расстройства системы дыхательных путей, характеризующегося воспалением и сужением дыхательных путей, а также их повышенной чувствительностью к вдыхаемым веществам. Факторы, ассоциированные с началом астмы, представляют собой аллергены, низкую температуру, физическую нагрузку, вирусные инфекции и SO₂, но не ограничиваются этим.

Как упомянуто выше, астма может быть ассоциирована с Th2-типом иммунного ответа, который характеризуется по меньшей мере частично Th2-цитокинами IL-4 и IL-5, а также переключением изотипа антитела на IgE. Th1- и Th2-иммунные ответы друг относительно друга имеют противоположную регуляцию, так что смещение иммунного ответа в сторону иммунного ответа Th1-типа может предотвращать или ослаблять иммунный ответ Th2-типа, включая аллергию. Таким образом, модифицированные олигорибонуклеотидные аналоги по изобретению сами по себе полезны для лечения субъекта, страдающего от астмы, поскольку аналоги могут смещать иммунный ответ в сторону иммунного ответа Th1-типа. Альтернативно или в дополнение к этому, модифицированные олигорибонуклеотидные аналоги по изобретению могут быть использованы в комбинации с аллергеном для лечения субъекта, страдающего от астмы.

Иммуностимулирующую композицию по изобретению также можно вводить в сочетании с противоастматической терапией. Обычные способы

лечения или предупреждения астмы вовлекают применение противоаллергических способов лечения (описанных выше) и множества других агентов, включающих ингалируемые агенты.

5 Лекарственные средства для лечения астмы, как правило, подразделяются на две категории: препараты быстрого действия и препараты пролонгированного контролируемого действия. Пациенты, страдающие от
10 астмы, принимают препараты пролонгированного контролируемого действия на ежедневной основе для лечения и контроля персистирующей астмы. Препараты пролонгированного контролируемого действия включают
15 противовоспалительные агенты, такие как кортикостероиды, хромолин-натрий и недокромил; бронходилататоры пролонгированного действия, такие как β_2 -агонисты пролонгированного действия и метилксантины; и модификаторы лейкотриенов. Лекарственные препараты быстрого действия включают
20 быстродействующие β_2 -агонисты, антихолинергические средства и системные кортикостероиды. Эти препараты имеют много побочных эффектов, ассоциированных с введением каждого из этих лекарственных средств, и ни
25 одно из этих лекарственных средств, взятых отдельно или в комбинации друг с другом, не способно предупреждать или полностью излечивать астму.

Противоастматические лекарственные средства включают ингибиторы
30 PDE-4 (фосфодиэстеразы 4), бронходилататоры/бета-2 агонисты, активаторы K^+ -каналов, антагонисты VLA-4, нейрокиновые антагонисты, ингибиторы синтеза тромбоксана A2 (TXA2), ксантины, антагонисты арахидоновой кислоты,
35 ингибиторы 5-липоксигеназы, антагонисты рецептора TXA2, антагонисты TXA2, ингибитор белков активации 5-липоксигеназы и ингибиторы протеаз, но не ограничиваются этим.

40 Бронходилататор/ β_2 -агонисты представляют собой класс соединений, которые вызывают расширение бронхов или релаксацию гладких мышц. Бронходилататоры/ β_2 -агонисты включают салметерол, сальбутамол, альбутерол, тербуталин, D2522/формотерол, фенотерол, битолтерол,
45 пирбутерол, метилксантины и орсипреналин, но не ограничиваются этим. β_2 -Агонисты и бронходилататоры пролонгированного действия представляют собой соединения, которые используются для продолжительного
50 предупреждения возникновения симптомов заболевания в дополнение к

противовоспалительной терапии. β_2 -Агонисты пролонгированного действия включают салметерол и альбутерол, но не ограничиваются этим. Эти соединения, как правило, используются в комбинации с кортикостероидами и
5 обычно не используются без противовоспалительной терапии. При их введении в чрезмерно высокой дозе они ассоциируются с такими побочными эффектами, как тахикардия, тремор скелетных мышц, гипокалемия и удлинение интервала QTc.
10

Метилксантины, включающие, например, теофиллин, используются для длительного контроля и предупреждения возникновения симптомов. Эти
15 соединения вызывают расширение бронхов в результате ингибирования фосфодиэстеразы и, вероятно, антагонизма аденозина. Особенно серьезная проблема, связанная с применением соединений этого типа, заключается в их дозозависимой острой токсичности. В результате для оценки токсичности и
20 сужения терапевтического диапазона, обусловленного индивидуальными различиями в метаболическом клиренсе, должен быть проведен стандартный мониторинг концентрации этих соединений в сыворотке крови. Побочные
25 эффекты включают тахикардию, тахиаритмии, тошноту и рвоту, стимуляцию центральной нервной системы, головную боль, эпилептические припадки, кровавую рвоту, гипергликемию и гипокалемию. Быстродействующие β_2 -
30 агонисты включают альбутерол, битолтерол, пирбутерол и тербуталин, но не ограничиваются этим. Некоторые из побочных эффектов, ассоциированных с введением быстродействующих β_2 -агонистов, включают тахикардию, тремор
35 скелетных мышц, гипокалемию, повышение уровня молочной кислоты, головную боль и гипергликемию, но не ограничиваются этим.

Хромолин-натрий и недокромил используются в качестве лекарственных
40 средств пролонгированного контролируемого действия для предупреждения основных симптомов астмы, вызываемых физической нагрузкой, или аллергических симптомов, вызываемых аллергенами. Полагают, что эти соединения блокируют ранние и поздние реакции с аллергенами посредством
45 подавления функции хлоридных каналов. Они также стабилизируют мембраны тучных клеток и ингибируют активацию и высвобождение медиаторов из эозинофилов и эпителиальных клеток. Для достижения максимального
50 эффекта такие соединения обычно необходимо вводить в течение 4-6 недель.

Антихолинергические средства обычно используются для ослабления острого бронхоспазма. Полагают, что эти соединения функционируют посредством конкурентного ингибирования мускариновых холинергических рецепторов. Антихолинергические средства включают ипратропия бромид, но не ограничиваются им. Эти соединения купируют только холинергически опосредованный бронхоспазм и не модифицируют реакцию на антиген. Побочные эффекты включают сухость во рту и выделение секрета из дыхательных путей, а у некоторых субъектов - усиление свистящих хрипов и затуманенное зрение при попадании в глаза.

Иммуностимулирующие полимеры по изобретению также могут быть использованы для лечения ремоделирования дыхательных путей. Ремоделирование дыхательных путей происходит в результате пролиферации гладкомышечных клеток и/или утолщения подслизистой оболочки дыхательных путей, что в конечном счете приводит к сужению дыхательных путей, приводящему к ограниченному поступлению воздуха. Иммуностимулирующие полимеры по изобретению могут предупреждать дальнейшее ремоделирование и даже уменьшать образование ткани в результате процесса ремоделирования.

Иммуностимулирующие полимеры по изобретению также полезны для улучшения выживания, дифференцировки, активации и созревания дендритных клеток. Иммуностимулирующие олигорибонуклеотиды обладают уникальной способностью стимулировать выживание, дифференцировку, активацию и созревание дендритных клеток.

Иммуностимулирующие полимеры по изобретению также увеличивают литическую активность клеток-естественных киллеров и антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). ADCC можно осуществлять с применением иммуностимулирующих полимеров в комбинации с антителом, специфичным к клеточной мишени, такой как раковая клетка. Когда иммуностимулирующий полимер вводят субъекту одновременно с антителом, то иммунную систему субъекта индуцируют к уничтожению опухолевой клетки. Антитела, пригодные для процедуры ADCC, включают антитела, взаимодействующие с клеткой в организме. Множество таких антител, специфичных для клеточных мишеней, были описаны в данной области техники, и многие имеются в продаже. В одном из воплощений антитело представляет собой IgG антитело.

В некоторых аспектах изобретения предложен способ усиления распространения эпитопов. Используемый в данной заявке термин “распространение эпитопов” относится к диверсификации эпитопной специфичности с исходного сфокусированного доминирующего эпитоп-специфического иммунного ответа, направленного против своего или чужеродного белка, на субдоминантные и/или криптические эпитопы на этом белке (внутримолекулярное распространение) или других белках (межмолекулярное распространение). Распространение эпитопов приводит в результате к специфическим для множества эпитопов иммунным ответам.

Иммунный ответ состоит из фазы исходного накопления, которая может быть опасной, как при аутоиммунном заболевании, или благоприятной, как при вакцинациях, и более поздней фазы отрицательной регуляции для возврата иммунной системы к гомеостазу и формированию памяти. Распространение эпитопов может быть важным компонентом обеих фаз. Усиление распространения эпитопов при формировании опухоли позволяет иммунной системе субъекта определять дополнительные эпитопы-мишени, первоначально не распознаваемые иммунной системой в ответ на первоначальный терапевтический протокол, уменьшая вероятность вариантов ускользания в популяции опухолей и, таким образом, влияя на развитие заболевания.

Олигорибонуклеотиды по изобретению могут быть полезны в обеспечении распространения эпитопов при терапевтически благоприятных показаниях, таких как рак, вирусные и бактериальные инфекции и аллергия. Способ в одном из воплощений включает стадии введения субъекту вакцины, которая включает антиген и адъювант, и последующего введения субъекту по меньшей мере двух доз иммуностимулирующих полимеров по изобретению в количестве, эффективном для индукции специфических в отношении множества эпитопов иммунных ответов. Способ в одном из воплощений включает стадии введения субъекту вакцины, которая включает опухолевый антиген и адъювант, и последующего введения субъекту по меньшей мере двух доз иммуностимулирующих полимеров по изобретению в количестве, эффективном для индукции специфических в отношении множества эпитопов иммунных ответов. Способ в одном из воплощений включает применение

терапевтического протокола, который приводит к экспозиции антигена с иммунной системой субъекта, а затем по меньшей мере два введения иммуностимулирующего олигорибонуклеотида по изобретению для индукции иммунных ответов, специфических в отношении множества эпитопов, т.е. для обеспечения распространения эпитопов. В различных воплощениях терапевтический протокол представляет собой хирургию, радиационную терапию, химиотерапию, другие противораковые лекарственные средства, вакцину или противораковую вакцину.

Терапевтический протокол может быть воплощен в сочетании с иммуностимулятором, в дополнение к последующей иммуностимулирующей терапии. Например, когда терапевтический протокол представляет собой вакцину, ее можно вводить в сочетании с адъювантом. Комбинация вакцины и адъюванта может представлять собой смесь или отдельные введения, т.е. инъекции (т.е. та же самая дренажная область). Введение не обязательно является одновременным. Если используют не одновременную инъекцию, то время введения может включать предварительную инъекцию адъюванта, а затем вакцинного препарата.

После осуществления терапевтического протокола начинается иммуностимулирующая монотерапия. Оптимизированная частота, длительность и область введения зависят от мишени и других факторов, но могут, например, представлять собой введение один раз или два раза в месяц в течение периода от шести месяцев до двух лет. Альтернативно, введение может осуществляться ежесуточно, раз в неделю или два раза в неделю, или введение может осуществляться много раз в течение суток, недели или месяца. В некоторых случаях длительность введения может зависеть от длительности терапии, например, она может закончиться через неделю, один месяц, один год или несколько лет. В других случаях монотерапия может быть непрерывной, как с внутривенной капельницей. Иммуностимулятор можно вводить в дренажную область, общую для мишеней.

Для применения в терапии различные дозы могут быть необходимы для лечения субъекта в зависимости от активности соединения, способа введения, цели иммунизации (т.е. профилактической или терапевтической), природы и тяжести расстройства, возраста и массы субъекта. Введение заданной дозы

может быть осуществлено путем разового введения в форме индивидуальной стандартной дозы или даже нескольких меньших стандартных доз. Множественное введение доз через специфические интервалы недель или
5 месяцев обычно для иммунных ответов, специфических в отношении бустерного антигена.

В комбинации с приведенным в данной заявке изложением путем выбора
10 среди различных активных соединений и массовых факторов, таких как сила, относительная биодоступность, масса организма пациента, тяжесть неблагоприятных побочных эффектов и предпочтительный способ введения, может быть запланирована эффективная профилактическая или
15 терапевтическая схема лечения, которая не вызывает значительной токсичности и полностью эффективна для лечения конкретного субъекта. Эффективное количество для конкретного применения может варьировать в зависимости от
20 таких факторов, как заболевание или состояние, которое лечат, конкретный терапевтический агент, который вводят, размер субъекта или тяжесть заболевания или состояния. Специалист в данной области техники может
25 эмпирически определить эффективное количество конкретной нуклеиновой кислоты и/или другого терапевтического агента без необходимости осуществления излишнего экспериментирования.

Дозы описанных в данной заявке соединений для субъекта типично
30 находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг до 10000 мг, типично от приблизительно 1 мкг/сутки до 8000 мг, и наиболее типично от приблизительно 10 мкг до 100 мкг. В терминах массы организма субъекта типичные дозы
35 находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг до 20 мг/кг/сутки, более типично от приблизительно 1 до 10 мг/кг/сутки, и наиболее типично от 1 до 5 мг/кг/сутки.

Фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновые кислоты и/или
40 другие соединения, могут быть введены любым путем, подходящим для введения лекарственных средств. Имеется множество путей введения. Конкретный выбранный способ зависит, безусловно, от конкретного выбранного
45 агента или агентов, конкретного состояния, которое лечат, и дозы, требующейся для терапевтической эффективности. Обсуждаемые в общем способы по изобретению могут быть применены на практике с использованием
50

любого способа введения, который является приемлемым с медицинской точки зрения, что означает любой способ, который дает эффективные уровни иммунного ответа, не вызывая клинически неприемлемых побочных эффектов.

5 В данной заявке обсуждаются предпочтительные способы введения. Для применения в терапии эффективное количество нуклеиновой кислоты и/или другого терапевтического агента может быть введено субъекту любым

10 способом, который доставляет агент на желаемую поверхность, например слизистую оболочку, системно.

Введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению

15 может быть осуществлено любыми способами, известными специалистам в данной области техники. Пути введения включают пероральный, парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, интраназальный, подъязычный, интратрахеальный, ингаляцию, подкожный,

20 внутриглазной, вагинальный и ректальный, но не ограничиваются этим. Для лечения или предупреждения астмы или аллергии такие соединения предпочтительно ингалируют, проглатывают или вводят системными путями.

25 Системные пути включают пероральный и парентеральный. В некоторых воплощениях ингалируемые лекарственные средства являются предпочтительными из-за непосредственной доставки в легкие, область

30 воспаления, прежде всего у астматиков. Несколько типов устройств регулярно используют для введения путем ингаляции. Эти типы устройств включают дозирующие ингаляторы (MDI), MDI, приводимые в действие дыханием, сухой порошковый ингалятор (DPI), распределительные/удерживающие камеры в

35 комбинации с MDI и небулайзеры.

Терапевтические агенты по изобретению можно доставить к конкретной ткани, типу клетки или иммунной системе, или к тому и другому, с помощью

40 вектора. В самом широком смысле "вектор" представляет собой любой носитель, способный облегчать перенос композиции к клеткам-мишеням. Вектор обычно транспортирует иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, антитело, антиген и/или специфическое в отношении расстройства

45 лекарственное средство к клеткам-мишеням с уменьшенной деградацией по сравнению со степенью деградации, которая может возникать в отсутствие вектора.

50

Как правило, полезные в изобретении векторы делят на два класса: биологические векторы и химические/физические векторы. Биологические векторы и химические/физические векторы полезны для доставки и/или захвата терапевтических агентов по изобретению.

Большую часть биологических векторов используют для доставки нуклеиновых кислот, и они наиболее подходят для доставки терапевтических агентов, которые представляют собой или включают иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты.

В дополнение к обсуждавшимся в данной заявке биологическим векторам, химические/физические векторы могут быть использованы для доставки терапевтических агентов, включающих иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, антитела, антигены и специфические в отношении расстройства лекарственные средства. Используемый в данной заявке термин "химический/физический вектор" относится к природной или синтетической молекуле, отличающейся от молекул, получаемых из бактериологических или вирусных источников, способной доставлять нуклеиновую кислоту и/или другое лекарственное средство.

Предпочтительный химический/физический вектор по изобретению представляет собой коллоидную дисперсную систему. Коллоидные дисперсные системы включают системы на основе липидов, включающие эмульсии масла в воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительная коллоидная система по изобретению представляет собой липосому. Липосомы представляют собой искусственные мембранные сосуды, которые полезны в качестве векторов доставки *in vivo* или *in vitro*. Показано, что в большие однослойные везикулы (LUV), размер которых находится в диапазоне 0,2-4,0 мкм, можно инкапсулировать большие макромолекулы. РНК, ДНК и интактные вирионы можно инкапсулировать в водное содержимое и доставлять к клеткам в биологически активной форме. Fraley et al., 1981, Trends Biochem. Sci. 6:77.

Липосомы могут быть нацелены на конкретную ткань путем сочетания липосомы со специфическим лигандом, таким как моноклональное антитело, сахар, гликолипид или белок. Лиганды, которые можно использовать для нацеливания липосомы на иммунную клетку, включают интактные молекулы или их фрагменты, которые взаимодействуют со специфическими в отношении

иммунных клеток рецепторами и молекулами, такие как антитела, которые взаимодействуют с маркерами клеточной поверхности иммунных клеток, но, не ограничиваются этим. Такие лиганды можно легко идентифицировать с помощью анализов связывания, хорошо известных специалистам в данной области техники. В других воплощениях липосому можно нацелить на рак путем ее сочетания с одним из иммунотерапевтических антител, обсуждавшихся выше. Дополнительно, вектор можно подвергнуть сочетанию с ядерным нацеливающим пептидом, который будет направлять вектор в ядро клетки-хозяина.

Липидные композиции для трансфекции имеются в продаже от QIAGEN, например EFFECTENE™ (нелипосомальный липид со специальным ДНК-конденсирующим энхансером) и SUPERFECT™ (новая действующая дендримерная технология). Липосомы имеются в продаже от Gibco BRL, например LIPOFECTIN™ и LIPOFECTACE™, которые образованы катионными липидами, такими как N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA) и диметилдиоктадециламмония бромид (DDAB). Способы получения липосом хорошо известны в данной области техники и описаны во многих публикациях. Обзор липосом также представлен в Gregoriadis G. (1985) *Trends Biotechnol.* 3:235-241.

По-видимому, некоторые катионные липиды, включающие, в частности, N-[1-(2,3-диолеилокси)-пропил]-N,N,N-триметиламмония метилсульфат (DOTAP), особенно благоприятны в комбинации с модифицированными олигорибонуклеотидными аналогами по изобретению.

В одном из воплощений носитель представляет собой биосовместимую микрочастицу или имплантат, который подходит для имплантации или введения млекопитающему-реципиенту. Примеры биodeградируемых имплантатов, которые полезны в соответствии с этим способом, описаны в опубликованной международной заявке PCT PCT/US/03307 (номер публикации WO 95/24929), озаглавленной "Polymeric Gene Delivery System". В PCT/US/0307 описана биосовместимая, предпочтительно биodeградируемая полимерная матрица для включения экзогенного гена под контролем соответствующего промотора. Полимерную матрицу можно использовать для достижения замедленного высвобождения терапевтического агента у субъекта.

Полимерная матрица предпочтительно находится в форме микрочастиц, таких как микросферы (в которых нуклеиновая кислота и/или другой терапевтический агент распределены по всей твердой полимерной матрице) или микрокапсулы (в которых нуклеиновая кислота и/или другой терапевтический агент хранятся в сердцевине, покрытой полимерной оболочкой). Другие формы полимерной матрицы для включения терапевтического агента включают в себя пленки, покрытия, гели, имплантаты и стенты. Размер и композицию для устройства полимерной матрицы выбирают таким образом, чтобы получить в результате благоприятную кинетику высвобождения в ткани, в которую вводят матрицу. Размер полимерной матрицы, кроме того, выбирают в соответствии со способом доставки, который будет использоваться, обычно инъекция в ткань или введение суспензии с помощью аэрозоля в области носа и/или легких. Когда используется аэрозольный путь, тогда полимерную матрицу и нуклеиновую кислоту и/или другой терапевтический агент предпочтительно включать в носитель в виде поверхностно-активного вещества. Композицию полимерной матрицы можно выбрать таким образом, чтобы она имела благоприятную скорость деградации и чтобы образовывался материал, который является биоадгезивным, для дополнительного увеличения эффективности переноса при нанесении матрицы на поверхность носа и/или легкого, которая подверглась повреждению. Композицию матрицы также можно выбрать таким образом, чтобы она не разрушалась, а быстро высвобождалась посредством диффузии в течение продолжительного периода времени. В некоторых предпочтительных воплощениях нуклеиновую кислоту вводят субъекту через имплантат, в то время как другой терапевтический агент вводят в экстренном порядке. Биосовместимые микросферы, которые подходят для доставки, такой как доставка в ротовую полость или слизистые оболочки, раскрыты в Chickering et al. (1996) *Biotech. Bioeng.* 52:96-101 и Mathiowitz et al. (1997) *Nature* 386:410-414, и в заявке PCT WO 97/03702.

Как небиodeградируемые, так и биodeградируемые полимерные матрицы можно использовать для доставки субъекту нуклеиновой кислоты и/или другого терапевтического агента. Предпочтительными являются биodeградируемые матрицы. Такие полимеры могут быть природными или синтетическими

полимерами. Полимер выбирают на основе периода времени, в течение которого желательно высвобождение, обычно порядка от нескольких часов до года или дольше. Как правило, наиболее желательным, в частности, для нуклеиновокислотных агентов, является высвобождение в течение периода времени в пределах от нескольких часов до трех-двенадцати месяцев. Полимер необязательно находится в форме гидрогеля, который может абсорбировать примерно вплоть до 90% его массы в воде и, кроме того, необязательно поперечно сшит с поливалентными ионами или другими полимерами.

Представляющие особый интерес биоадгезивные полимеры включают биodeградируемые гидрогели, описанные H.S. Sawhney, C.P. Pathal и J.A. Hubell в *Macromolecules*, 1993, 26:581-587, сущность которой включена в данную заявку. Они включают полигалактуроновые кислоты, казеин, желатин, глютин, полиангидриды, полиакриловую кислоту, альгинат, хитозан, поли(метилметакрилаты), поли(этилметакрилаты), поли(бутилметакрилат), поли(изобутилметакрилат), поли(гексилметакрилат), поли(изодецилметакрилат), поли(лаурилметакрилат), поли(фенилметакрилат), поли(метилакрилат), поли(изопропилакрилат), поли(изобутилакрилат) и поли(октадецилакрилат).

Если терапевтический агент представляет собой нуклеиновую кислоту, то также может быть желательным использование агентов уплотнения. Агенты уплотнения также можно использовать самостоятельно или в комбинации с биологическим или химическим/физическим вектором. Используемый в данном описании термин "агент уплотнения" относится к агенту, такому как гистон, который нейтрализует отрицательные заряды на нуклеиновой кислоте и, таким образом, делает возможным уплотнение нуклеиновой кислоты в тонкую гранулу. Уплотнение нуклеиновой кислоты облегчает захват нуклеиновой кислоты клеткой-мишенью. Агенты уплотнения можно использовать самостоятельно, т.е. для доставки нуклеиновой кислоты в форме, которая более эффективно поглощается клеткой, или более предпочтительно, в комбинации с одним или более одним из вышеописанных векторов.

Другие примеры композиций, которые можно использовать для облегчения поглощения нуклеиновой кислоты, включают фосфат кальция и

другие химические медиаторы внутриклеточного транспорта, микроинъекционные композиции, композиции для электропорации и гомологичной рекомбинации (например для интеграции нуклеиновой кислоты в предварительно выбранное местоположение в пределах хромосомы клетки-мишени).

Как обсуждалось выше, полимеры по изобретению готовят с носителем для доставки. Например, были описаны следующие носители для доставки: кохлеаты; эмульсомы; ISCOM[®]; живые бактериальные векторы (например *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus Calmette-Guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*); живые вирусные векторы (например Vaccinia, аденовирус, Herpes Simplex); микросферы; вакцины на основе нуклеиновых кислот; полимеры (например карбоксиметилцеллюлоза, хитозан); полимерные кольца; протеосомы; фторид натрия; трансгенные растения. В некоторых воплощениях изобретения носитель для доставки представляет собой липосому, ниосому, липоплекс, полиплекс, липополиплекс, эмульсию воды в масле (W/O), эмульсию масла в воде (O/W), множественную эмульсию воды в масле в воде (W/O/W), микроэмульсию, наноэмульсию, мицеллу, дендример, виросому, вирусоподобную частицу, полимерную наночастицу, такую как наносфера или нанокапсула, полимерную микрочастицу, такую как микросфера или микрокапсула.

Препараты по изобретению вводят в фармацевтически приемлемых растворах, которые стандартно могут содержать фармацевтически приемлемые концентрации соли, буферных агентов, консервантов, совместимых носителей, адъювантов и возможно других терапевтических ингредиентов. В некоторых воплощениях композиция является стерильной.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает один или более чем один совместимый твердый или жидкий наполнитель, разбавитель или инкапсулирующее вещество, которые подходят для введения человеку или другому позвоночному животному. Термин "носитель" означает органический или неорганический ингредиент, природный или синтетический, с которым объединяют активный ингредиент для облегчения применения. Компоненты фармацевтических композиций также можно смешивать с соединениями по настоящему изобретению и друг с другом таким образом, чтобы не было

взаимодействия, которое могло бы существенно ослабить желаемую фармакологическую эффективность.

Для перорального введения соединения (т.е. нуклеиновые кислоты, антигены, антитела и другие терапевтические агенты) можно легко приготовить путем комбинирования активного(ых) соединения(ий) с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области техники. Такие носители дают возможность приготавливать соединения по настоящему изобретению в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т.п. для перорального введения субъекту, которого лечат. Фармацевтические препараты для перорального введения могут быть изготовлены в виде твердого эксципиента, возможно путем измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул, после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, с получением таблеток или ядер драже. Подходящие эксципиенты представляют собой, в частности, такие наполнители, как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; такие целлюлозные препараты, как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (PVP). Если желательно, можно добавить разрыхлители, такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Возможно композиции для перорального введения можно также приготовить в солевом растворе или буферах для нейтрализации внутренних кислотных условий или их можно вводить без носителей.

Ядра драже покрывают подходящими покрытиями. Для этих целей могут быть использованы концентрированные сахарные растворы, которые могут возможно содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, гель карбопол, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, лаковые растворы и подходящие органические растворители или их смеси. В покрытия для таблеток или драже могут быть добавлены красители или пигменты для идентификации или характеристики различных комбинаций доз активных соединений.

Фармацевтические препараты, которые можно использовать перорально, включают push-fit (твердые составные) капсулы, изготовленные из желатина, а

также мягкие запечатанные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Твердые составные капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующими веществами, таким как крахмалы, и/или смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и возможно стабилизаторами. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы. Можно также использовать микросферы, изготовленные для перорального введения. Такие микросферы хорошо определены в данной области техники. Все препараты для перорального введения должны находиться в дозах, подходящих для такого введения.

Для трансбуккального введения композиции могут принимать форму таблеток или лепешек, изготовленных обычным способом.

Для введения путем ингаляции соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением для удобства могут доставляться в форме аэрозольного спрея из контейнера, находящегося под давлением, или небулайзера с применением подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением дозированную единицу можно определить, снабжая контейнер клапаном для доставки отмеренного количества. Можно изготовить капсулы и картриджи, например, из желатина для применения в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Соединения, предназначенные для системной доставки, могут быть изготовлены в виде препарата для парентерального введения посредством инъекции, например посредством болюс-инъекции или посредством непрерывной инфузии. Препараты для инъекции могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в мультидозовых флаконах с добавлением консерванта. Эти композиции могут быть также приготовлены в форме суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных разбавителях, и они могут содержать технологические

добавки, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

5 Фармацевтические препараты для парентерального введения включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных соединений могут быть приготовлены в виде подходящих
10 масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или разбавители включают жирные масла, такие как кунжутное масло; или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды; или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут
15 содержать вещества, которые увеличивают вязкость данной суспензии, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Возможно, суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость соединений, чтобы получать
20 высококонцентрированные растворы.

Альтернативно, активные соединения могут находиться в порошковой форме, которая перед применением может быть разведена подходящим
25 разбавителем, например, стерильной апиrogenной водой.

Указанные соединения могут быть также приготовлены в виде композиций для ректального или вагинального введения, таких как
30 суппозитории или удерживающие клизмы, например, содержащие стандартные основы для суппозитория, такие как масло какао или другие глицериды.

Помимо описанных выше препаратов соединения также могут быть
35 приготовлены в виде депо-препарата. Такие препараты длительного действия могут быть приготовлены с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол, или в виде умеренно растворимых производных,
40 например, в виде умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции также могут содержать подходящие твердые или гелевые носители или эксципиенты. Примеры таких носителей или
45 наполнителей включают карбонат кальция, ортофосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли, но не ограничиваются этим.

Подходящие жидкие или твердые формы фармацевтических препаратов представляют собой, например, водные или солевые растворы для ингаляции, микроинкапсулированные, помещенные внутрь кохлеата, нанесенные на микроскопические частицы золота, содержащиеся в липосомах, распыляемые, аэрозоли, гранулы для имплантации в кожу или высушенные на остром предмете, делающем царапины на коже. Фармацевтические композиции также включают гранулы, порошки, таблетки, покрытые таблетки, (микро)капсулы, суппозитории, сиропы, эмульсии, суспензии, кремы, капли или препараты с длительным высвобождением активных компонентов, в которых обычно используют, как описано выше, эксципиенты и добавки и/или вспомогательные вещества, такие как дезинтегрирующие вещества, связующие вещества, агенты для покрытия, агенты набухания, смазывающие вещества, корригенты, подсластители или солюбилизаторы. Фармацевтические композиции подходят для применения в различных системах доставки лекарственного средства. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см. в Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

Нуклеиновые кислоты и возможно другие терапевтические средства и/или антигены могут быть введены *per se* (в чистом виде), либо в форме фармацевтически приемлемой соли. Когда эти соли используются в медицинских целях, тогда они должны быть фармацевтически приемлемыми, но для получения таких фармацевтически приемлемых солей для удобства могут быть использованы соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми. Такие соли включают соли, полученные из следующих кислот: соляной, бромистоводородной, серной, азотной, ортофосфорной, малеиновой, уксусной, салициловой, пара-толуолсульфоновой, винной, лимонной, метансульфоновой, муравьиной, малоновой, янтарной, нафталин-2-сульфоновой и бензолсульфоновой кислот, но не ограничиваются этим. Кроме того, такие соли могут быть получены в виде солей щелочных или щелочноземельных металлов, таких как натриевые, калиевые или кальциевые соли группы карбоновой кислоты.

Подходящие забуферивающие агенты включают уксусную кислоту и ее соль (1-2% масс./об.); лимонную кислоту и ее соль (1-3% масс./об.); борную кислоту и ее соль (0,5-2,5% масс./об.) и ортофосфорную кислоту и ее соль (0,8-

2% масс./об.). Подходящие консерванты включают бензалкония хлорид (0,003-0,03% масс./об.); хлорбутанол (0,3-0,9% масс./об.); парабены (0,01-0,25% масс./об.) и тимеросал (0,004-0,02% масс./об.).

Эти композиции для удобства могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть изготовлены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Все способы включают стадию приведения этих соединений в ассоциацию с носителем, который представляет собой один или более вспомогательных ингредиентов. В общем композиции приготавливают путем однородного и непосредственного приведения этих соединений в ассоциацию с жидким носителем, тонкоизмельченным твердым носителем или и тем и другим и затем, если необходимо, придания формы этому продукту. Жидкие стандартные дозы представляют собой флаконы или ампулы. Твердые стандартные дозы представляют собой таблетки, капсулы и суппозитории.

Другие системы доставки могут включать в себя системы доставки с контролируемым во времени высвобождением, системы доставки с замедленным или длительным высвобождением. Такие системы могут позволить избежать повторного введения этих соединений, что увеличивает удобство для субъекта и лечащего врача. Специалистам в данной области техники доступно и известно много типов систем доставки с регулируемым высвобождением. Они включают в себя системы на основе полимеров, таких как поли(лактиды-гликолиды), кополиоксалаты, поликапролактоны, полиэфирамиды, сложные полиортоэфир, полигидроксимасляную кислоту и полиангидриды. Микрокапсулы из вышеуказанных полимеров, содержащие лекарства, описаны, например, в патенте США №5075109. Системы доставки также включают неполимерные системы, такие как: липиды, включающие стерин, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирные кислоты или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; системы высвобождения на основе гидрогеля; кремнийорганические системы; системы на основе пептидов; восковые покрытия; прессованные таблетки, в которых использованы обычные связующие агенты и эксципиенты; частично конденсированные имплантаты и т.п. Конкретные примеры включают: (а) эрозийные системы, в которых агент по изобретению содержится в форме

внутри матрикса, такие как описанные в патентах США №№ 4452775, 4675189 и 5736152, и (б) диффузионные системы, в которых активный компонент проникает с контролируемой скоростью из полимера, такие как описанные в патентах США №№ 3854480, 5133974 и 5407686, но не ограничиваются этим. Кроме того, могут быть использованы системы доставки с использованием насосных устройств, некоторые из которых приспособлены для имплантации.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими Примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. Полное содержание всех ссылок (включающих литературные ссылки, изданные патенты, опубликованные заявки на патенты и находящиеся на одновременном рассмотрении заявки на патенты), процитированные в этой заявке на патент, включены в данную заявку посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

TLR7 и TLR8 распознают одноцепочечную РНК или короткие олигонуклеотиды (ORN). Инкубация иммунных клеток, экспрессирующих один или оба TLR, приводит к индукции продукции цитокинов. Благодаря различным картинам экспрессии двух рецепторов TLR7-опосредованный сигнальный путь, как полагают, стимулирует продукцию IFN- α человеческими рDC, тогда как активация TLR8 приводит к активации в основном mDC и моноцитов, продуцирующих IL-12, TNF- α и IFN- γ . Продемонстрировано существование РНК-мотивов, специфически индуцирующих активность TLR8 и TLR7/8. В следующих Примерах показана идентификация дополнительного мотива, который специфичен для скелета. Важная находка состоит в том, что полимеры, содержащие этот РНК-мотив, индуцируют в основном IFN- α , что свидетельствует о сильном иммуностимулирующем мотиве, который не стимулирует значительных уровней провоспалительных цитокинов.

Способы:

ELISA-анализы:

Человеческие PBMC инкубировали с последовательными разведениями ORN в присутствии DOTAP (начиная с 2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP), и супернатанты анализировали с помощью ELISA в отношении IFN- α и IL-12p40 через 24 часа. Представлено среднее значение $\pm$ SEM для 3 доноров.

Обнаружение цитокинов:

Человеческие PBMC ресуспендировали в концентрации 5×10^6 клеток/мл и добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты (250 мкл/лунку). PBMC инкубировали с последовательными разведениями ORN в присутствии DOTAP (начиная с 2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP), и культуральные супернатанты (SN) собирали через 24 ч. Если их не использовали немедленно, то SN хранили при -20°C до тех пор, пока не потребуется.

Количества цитокинов в SN оценивали с использованием имеющегося в продаже набора для ELISA для определения IL-12p40 (от BD Biosciences, Heidelberg, Germany), или внутрифирменного набора для ELISA для определения IFN- α , разработанного с использованием имеющихся в продаже антител (PBL, New Brunswick, NJ, USA).

Для анализа широкого набора цитокинов и хемокинов осуществляли мультиплексный анализ на системе luminex от Bio-Rad (Munich, Germany) и с использованием мультиплексных наборов от Biosource (Solingen, Germany).

Пример 1: Идентификация иммуностимулирующего полимера, который индуцирует TLR7-, но не TLR8-опосредованные цитокины.

Четыре ORN и положительный контроль тестировали в отношении их способности индуцировать IFN- α (последовательности см. в Таблице). ORN инкубировали с человеческими PBMC, и супернатанты анализировали в отношении IFN- α с помощью ELISA. ORN SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5 имели одинаковую последовательность оснований, но SEQ ID NO:5 имеет фосфоротиоатный (PS) скелет, тогда как ORN SEQ ID NO:3 имеет фосфодиэфирный (PO) скелет. Неожиданно, SEQ ID NO:5 индуцировала только фоновые уровни IFN- α , тогда как SEQ ID NO:3 индуцировала максимальные уровни IFN- α , сравнимые с положительным контролем ODN SEQ ID NO:1, который имеет оптимизированный GU-богатый мотив в фосфоротиоатном скелете (Фиг. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что последовательности ORN SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5 скелет PO вызывали значительную индукцию IFN- α .

Два других ORN, имеющих PO скелет, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4, также тестировали в отношении их способности индуцировать IFN- α , и показали, что они индуцируют только очень низкие уровни IFN- α . Как показано путем

сравнения последовательностей SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, присутствие одного уридина (U) значительно усиливало индукцию IFN- α . Уридиновый нуклеотид встроен в определенный мотив последовательности. Присутствие одного U не в этом мотиве значительно уменьшало продукцию IFN- α , как показано путем сравнения SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4.

ORN SEQ ID NO:3 индуцирует в основном продукцию IFN- α (см. также Фиг. 2A), наиболее вероятно TLR7-опосредованного, но индуцирует в очень малой степени и другие (TLR8-опосредованные) цитокины, такие как IL-12 (Фиг. 2B), TNF- α (не показан) или IFN- γ (не показан).

Таблица 1

SEQ ID NO:1	rC*rC*rG*rU*rC*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rG*rA*rC*rU*rC
SEQ ID NO:2	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:4	rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rU-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA
SEQ ID NO:5	rA*rA*rA*rC*rG*rC*rU*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rA*rG

Скелеты ORN: "-" означает фосфодиэфир, "*" означает фосфоротиоат.

Пример 2: Идентификация нового иммуностимулирующего РНК-мотива: CUCA

Для определения оптимального скелет-специфического иммуностимулирующего мотива конструировали ORN и тестировали в отношении их способности индуцировать IFN- α . В противоположность ранее идентифицированным РНК-мотивам, новый мотив определяли таким образом, что он является уникальным и специфическим в отношении ORN с фосфодиэфирными скелетами (Фиг. 3). Человеческие PBMC инкубировали с ORN, и супернатанты анализировали с помощью ELISA в отношении IFN- α . Определили неожиданно короткий UCA-мотив. Продемонстрировали важность присутствия аденинового основания в этой последовательности. Сравнение SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:6 (см. Таблицу 2) показало, что оптимальный мотив включал основание 3' в UC. Сравнение SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12 подтвердило важность цитидина на 3'-стороне уридина.

Таблица 2

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:6	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rU-rC
SEQ ID NO:7	rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rU-rC-rA-rG
SEQ ID NO:11	rG-rC-rC-rA-rC-rC-rG-rA-rG-rC-rU-rG-rA-rA-rG-rG-rC-rA-rC-rC

SEQ ID NO:12	rG-rC-rC-rA-rC-rC-rG-rA-rG-rC-rU-rC-rA-rA-rG-rG-rC-rA-rC-rC
--------------	---

Замена центрального С в предполагаемом минимальном мотиве привело к утрате IFN- α -индуцирующей активности в случае UGA (SEQ ID NO:8) и UAA (SEQ ID NO:9) и к уменьшению IFN- α ответа в случае UUA (SEQ ID NO:10) (см. Фиг. 4) в контексте этих ORN. Низкая индукция IFN- α для SEQ ID NO:10 наиболее вероятно являлась следствием присутствия мотива GCUU, содержащего два U.

Эти ORN также продемонстрировали, что вновь определенный минимальный мотив является весьма специфическим для индукции смещенного в сторону IFN- α иммунного ответа, поскольку все 3 PO ORN без С в мотиве (SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10) индуцировали гораздо более высокие уровни IL-12 по сравнению с родительским ORN SEQ ID NO:3, содержащим UCA-мотив (см. Таблицу 3).

Таблица 3

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:8	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rG-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:9	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rA-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:10	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rU-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

Дополнительное тестирование вариаций последовательности привело к данным, демонстрирующим, что аденозиновая группировка в UCA-мотиве важна для активности IFN- α (Фиг. 5, последовательности в Таблице 4). Человеческие PBMC инкубировали с ORN, и супернатанты анализировали с помощью ELISA в отношении IFN- α и IL-12p40. Замена аденозина в UCA-мотиве на С или G (SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14) давала ORN, который индуцировал только фоновые уровни IFN- α . SEQ ID NO:15 (UCU) индуцировала умеренные количества IFN- α , но меньше, чем SEQ ID NO:3. Индукция, наиболее вероятно, являлась следствием образования дополнительной последовательности UCUG. Кроме того, индукция IL-12 SEQ ID NO:3 была очень низкой по сравнению с ORN SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:15.

Таблица 4

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:13	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rC-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:14	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rG-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:15	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rU-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

Для дополнительной оценки необходимости в дополнительных нуклеотидах, окружающих минимальный мотив, нуклеотидные модификации по 3'- и 5'-концам UCA-мотива тестировали в отношении их активностей индуцировать IFN- α по сравнению с IL-12 (последовательности представлены в Таблице 5). Как показано на Фиг. 6, в области 5' минимального UCA-мотива только присутствие цитидинового (CUCA, SEQ ID NO:3) или уридинового нуклеотида (UUCA, SEQ ID NO:21) приводило к ORN с высокими свойствами индукции IFN- α . Тем не менее, описанную неожиданную активность ORN, индуцирующую большое количество IFN- α , но без индукции большого количества IL-12p40, обнаруживали только тогда, когда уридин не был представлен в этом положении, тогда как мотив UUCA приводил к высокой продукции IFN- α и высокой продукции IL-12.

Таблица 5

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:19	rA-rA-rA-rC-rG-rG-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:20	rA-rA-rA-rC-rG-rA-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:21	rA-rA-rA-rC-rG-rU-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

Дополнительный анализ последовательности продемонстрировал, что, по-видимому, нуклеотидные положения за 4-мерным мотивом CUCA не являются критичными и не влияют на способность ORN индуцировать продукцию IFN- α (Таблица 6). Тем не менее, эти нуклеотиды не влияют на продукцию IL-12, как показано на Фиг. 7. По-видимому, ни один нуклеотид с 5'-стороны (Фиг. 7A, SEQ ID NO:22, 23 и 24) мотива CUCA, ни с 3'-стороны (Фиг. 7B, SEQ ID NO:16, 17 и 18) не влияет на IFN- α -индуцирующую активность. По-видимому, эти нуклеотиды влияют только на индукцию IL-12. Поэтому для оптимального TLR7-специфического профиля индукции эти положения предпочтительно не должны представлять собой уридин, как в SEQ ID NO:24 и SEQ ID NO:18, поскольку эти ORN демонстрируют относительно сильные IL-12-индуцирующие способности (Фиг. 7 C и Фиг. 7 D).

Таблица 6

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:16	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rA-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:17	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rC-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:18	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rU-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:22	rA-rA-rA-rC-rA-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

SEQ ID NO:23	rA-rA-rA-rC-rC-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:24	rA-rA-rA-rC-rU-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

Пример 3: Цитокиновый профиль CUCA-мотива ORN

Иммуностимулирующий мотив CUCA в ORN SEQ ID NO:27 (GACACACACUCACACACACACA) тестировали в отношении его способности индуцировать широкое разнообразие цитокинов. Цитокиновую индукцию ORN SEQ ID NO:27 сравнивали с отрицательным контролем (GACACACACACACACACACACACA; SEQ ID NO:25), не-UCA ORN с U-богатым 3'-концом (GACACACACACACACACACACUUU; SEQ ID NO:26), и положительным контролем (GACACACACACUCACACACACACA; SEQ ID NO:28). Человеческие PBMC из крови трех здоровых доноров инкубировали в течение 24 ч с последовательными разведениями ORN в присутствии DOTAP (начиная с 2 мкМ ORN и 25 мкг/мл DOTAP). SN собирали и концентрацию цитокинов или хемокинов для различных цитокинов и хемокинов измеряли с помощью ELISA. Результаты представлены на Фиг. 8-11. SEQ ID NO:27 индуцирует IFN- α и в меньшей степени связанные с IFN- α молекулы IP-10 и MCP-1.

Для анализа большего набора цитокинов и хемокинов осуществляли мультиплексный анализ с помощью системы Luminex и мультиплексных наборов. При этой исходной неколичественной оценке данных Luminex использовали двух доноров. Результаты обобщены в нижеприведенной Таблице 7. Кроме того, SEQ ID NO:27 индуцирует только IFN- α и IP-10 и в меньшей степени MIP-1.

Таблица 7

	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27	DOTAP
IL-1B	-	+	+++	-	-
IL-1Ra	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-
IL-2R	-	+	+++	-	-
IL-4	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
IL-5	-	-	-		
IL-6	-	+	+++	-	-
IL-7	-	++	+++	-	+

	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27	DOTAP
IL-8	-	+	+	-	+
IL-10	-	-	+++	-	-
IL-12p40	-	-	+++	-	-
IL-13	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
IL-15	-	+	+++	-	-
IL-17	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
TNF- α	-	-	+++	-	-
IFN- α	-	-	+++	++	-
IFN- γ	-	-	+++	-	-
GM-CSF	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
MIP-1a	-	+	+++	-	-
MIP-1b	-	+	+++	-	-
IP-10	-	-	+	++	+
MIG	-	+	+++	-	-
Эотаксин	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Rantes	-	-	+	-	+
MCP-1	-	+	++	+	+

н.о. = не определяли

Пример 4: Значительная индукция Th1-цитокинов и хемокинов с помощью ORN, содержащих UCA-мотив

ORN с UCA-мотивом тестировали в отношении индукции цитокинов и хемокинов *in vivo*. Мышей BALB/c делили на две группы по пять в каждой и ORN, DOTAP или забуференный фосфатом физиологический раствор (HBS) вводили внутривенно. У первой группы животных кровь отбирали через 3 часа после инъекции, и уровни IP-10, IFN- α , TNF- α , IL-2, IL-12, IL-6 и IL-10 в сыворотке определяли с использованием подходящего цитокинспецифического ELISA. У второй группы животных кровь отбирали через 24 часа после инъекции и определяли уровни IFN- α и IP-10 в сыворотке. Способность UCA ORN SEQ ID NO:3 индуцировать цитокины и хемокины сравнивали со способностью двух ORN (GACACACACACACACACACAUU; SEQ ID NO:30; и UUAUUUUAUUUAUUUAUUU (фосфоротиоатный скелет); SEQ ID NO:33), которые индуцируют TLR7- и TLR8-ассоциированные цитокины, и двух ORN

(UUGUUGUUGUUGUUGUUGUU; SEQ ID NO:31; и UUAUUUAUUUAUUUAUUUAUU (фосфодиэфирный скелет); SEQ ID NO:32), которые индуцируют в основном TLR8-ассоциированные цитокины. CpG ODN 1826 (TCCATGACGTTCCTGACGTT; SEQ ID NO: 36) также использовали в качестве контроля. SEQ ID NO:3 индуцировала IFN- α (Фиг. 12А и С) и IP-10 (Фиг. 12В и D) и в момент времени 3 часа и в момент времени 24 часа, но не индуцировала значительные количества TNF- α , IL-2, IL-12, IL-6 или IL-10 (Фиг.13А-Е, соответственно) в момент времени 3 часа. Таким образом, SEQ ID NO:3 индуцировала только IFN- α и IFN- α -ассоциированные цитокины.

Кроме того, показали, что UCA ORN активирует как В-, так и Т-клетки селезенки. SEQ ID NO:3 активировала CD3⁺ Т-клетки селезенки (Фиг. 14А и В) и В-клетки DX5⁺ (Фиг. 14С и D).

Пример 5: Присутствие UCA-мотива, а не U, важно для индукции IFN- α

В этом эксперименте продемонстрировано, что присутствие одного из трех уридинов не достаточно для индукции IFN- α . Человеческие PBMC от трех здоровых доноров инкубировали в течение 24 ч с разными количествами ORN (SEQ ID NO 26-30; Таблица 8) в присутствии DOTAP (исходная концентрация: 2 мкМ ORN плюс 25 мкг/мл DOTAP, последовательное разведение 1:3 в PBS). IFN- α измеряли в супернатантах с использованием соответствующего ELISA.

Таблица 8

SEQ ID NO:26	rG-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rU-rU-rU
SEQ ID NO:27	rG-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rU-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA
SEQ ID NO:28	rU*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rU
SEQ ID NO:29	rG-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rU
SEQ ID NO:30	rG-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rC-rA-rU-rU

Результаты представлены на Фиг. 15. SEQ ID NO 26, 29 и 30 без UCA-мотива не индуцировали IFN- α , несмотря на присутствие вплоть до трех уридинов в этих ORN. Напротив, SEQ ID NO:27, содержащая только один U, встроенный в UCA-мотив, индуцировала значительные количества IFN- α .

Пример 6: Индукция цитокинов in vivo строго зависит от TLR-7

В этом эксперименте показано, что у дефицитных по TLR7 мышей не реагируют на ORN по изобретению. Мышей, нокаутированных по TLR9 (TLR9 KO) и TLR7 (TLR7 KO), подвергали обратному скрещиванию с C57BL/6, и

контрольным мышам C57BL/6 (n=4 на группу) внутривенно инъецировали 100 мкг выбранного ORN (SEQ ID NO:3, 28, или 31) или положительного контроля CpG ODN 1826 (SEQ ID NO:36) 1:2 в DOTAP (Sigma) или забуференном фосфатом физиологическом растворе (HBS) в качестве отрицательного контроля. Через три часа после инъекции плазму отбирали и анализировали в отношении IFN- α , IP-10, IL-12 и IL-6 с использованием соответствующего Luminex и ELISA.

Результаты представлены на Фиг. 16. Мыши TLR7 KO продемонстрировали по существу отсутствие индукции IFN- α , IP-10, IL-12 или IL-6 в ответ на SEQ ID NO:3, 28 или 31, но сильную индукцию этих же цитокинов в ответ на CpG ODN. Наоборот, мыши TLR9 KO продемонстрировали различные степени индукции IFN- α , IP-10, IL-12 и IL-6 в ответ на SEQ ID NO:3, 28 или 31, и отсутствие индукции этих же цитокинов в ответ на CpG ODN. Контрольные мыши C57BL/6 показали различные степени индукции IFN- α , IP-10, IL-12, и IL-6 в ответ на SEQ ID NO:3, 28, или 31 и сильную индукцию этих же цитокинов в ответ на CpG ODN.

Пример 7: Индукция цитокинов in vivo строго зависит от MyD88

В этом эксперименте показано, что мыши, дефицитные по MyD88, не реагировали с ORN по изобретению. Нокаутированных по MyD88 мышей (MyD88 KO) подвергали обратному скрещиванию с C57BL/6, и контрольным мышам C57BL/6 (n=4 на группу) внутривенно инъецировали 100 мкг выбранного ORN (SEQ ID NO:3, 28 или 31) или положительного контроля CpG ODN 1826 (SEQ ID NO:36) 1:2 в DOTAP (Sigma) или забуференном фосфатом физиологическом растворе (HBS) в качестве отрицательного контроля. Через три часа после инъекции отбирали образцы плазмы крови и анализировали в отношении IFN- α и IP-10 с использованием соответствующего Luminex и ELISA.

Результаты представлены на Фиг. 17. Мыши MyD88 KO продемонстрировали по существу отсутствие индукции IFN- α или IP-10 в ответ на SEQ ID NO:3, 28 или 31 и, аналогично, в ответ на CpG ODN. Наоборот, контрольные мыши C57BL/6 продемонстрировали сильную индукцию IFN- α и IP-10 в ответ на SEQ ID NO:3, 28 и 31, а также в ответ на CpG ODN.

В общем, определили, что новый скелет-специфический мотив отвечает за индукцию IFN- α (наиболее вероятно, TLR7-опосредованную) и небольшую

активацию других (наиболее вероятно, TLR8-опосредованных) цитокинов, таких как IL-12, IFN- γ или TNF- α . Минимальный мотив, определяющий эти свойства, представляет собой rU-rC-rA. Скелет представляет собой фифодизфир.
5 Оптимальный мотив в соответствии с этими данными представляет собой rN-rC-rU-rC-rA-rN, где N = C, A, G, но не U (для минимальных TLR8-опосредованных цитокиновых ответов).

10 Таким образом, несмотря на то, что описано несколько аспектов по меньшей мере одного воплощения данного изобретения, специалистам в данной области техники очевидно, что могут быть произведены различные
15 изменения, модификации и улучшения. Предполагают, что такие изменения, модификации и улучшения составляют часть данного описания и находятся в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, вышеприведенное
20 описание и графические материалы представлены только в качестве примера.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

	<110>	КОУЛИ ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГМБХ	
5	<120>	МОТИВЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РНК В КОНТЕКСТЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ, ИНДУЦИРУЮЩИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПРОФИЛИ	
	<130>	PC19793A	
10	<150>	US 60/964,448	
	<151>	2007-08-13	
	<160>	36	
	<170>	PatentIn version 3.4	
15	<210>	1	
	<211>	18	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
20	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	1	
		ccgcucgucguc ugugacuc	18
25	<210>	2	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
30	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	2	
		aaacgcacacg ccaaacgcacg	19
35	<210>	3	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
40	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	3	
		aaacgcacacg ccaaacgcacg	19
45	<210>	4	
	<211>	18	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
50	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	4	
		aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	18

<210> 5
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

5 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(19)
 <223> фосфоротиоатный скелет

<400> 5
 ааасгсисаг ссаагсгаг 19

15 <210> 6
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 6
 ааасгсасаг ссаагсис 19

25 <210>
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

30 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 7
 асгсасагсс аагсисаг 19

35 <210> 8
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

40 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 8
 ааасгсигаг ссаагсгаг 19

45 <210> 9
 <211> 19
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

50 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 9
 ааасгсгааг ссаагсгаг 19

	<210> 10		
	<211> 19		
	<212> РНК		
	<213> Искусственная последовательность		
5	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 10		
	aaacgcuaag ccaaacgac		19
10	<210> 11		
	<211> 20		
	<212> РНК		
	<213> Искусственная последовательность		
15	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 11		
	gccaccgac ugaaggcacc		20
20	<210> 12		
	<211> 20		
	<212> РНК		
	<213> Искусственная последовательность		
25	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 12		
	gccaccgac ucaaggcacc		20
30	<210> 13		
	<211> 19		
	<212> РНК		
	<213> Искусственная последовательность		
35	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 13		
	aaacgcucgg ccaaacgac		19
40	<210> 14		
	<211> 19		
	<212> РНК		
	<213> Искусственная последовательность		
45	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 14		
	aaacgcucgg ccaaacgac		19
50	<210> 15		
	<211> 19		
	<212> РНК		
	<213> Искусственная последовательность		

	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	15	
5		aaacgcucucg ccaaacgag	19
	<210>	16	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
10	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	16	
15		aaacgcucuaa ccaaacgag	19
	<210>	17	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
20	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	17	
25		aaacgcucac ccaaacgag	19
	<210>	18	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
30	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	18	
35		aaacgcucuu ccaaacgag	19
	<210>	19	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
40	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	19	
		aaacgcucag ccaaacgag	19
45	<210>	20	
	<211>	19	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
50	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	20	

	aaacguucag ccaaacgag	19
5	<210> 21 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная последовательность <220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
10	<400> 21 aaacguucag ccaaacgag	19
15	<210> 22 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная последовательность <220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
20	<400> 22 aaacacucag ccaaacgag	19
25	<210> 23 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная последовательность <220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
30	<400> 23 aaacccucag ccaaacgag	19
35	<210> 24 <211> 19 <212> РНК <213> Искусственная последовательность <220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
40	<400> 24 aaacucucag ccaaacgag	19
45	<210> 25 <211> 24 <212> РНК <213> Искусственная последовательность <220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
50	<400> 25 gacacacaca cacacacaca caca	24

	<210> 26	
	<211> 24	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
5	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 26	
	gасасасаса сасасасаса сиии	24
10	<210> 27	
	<211> 24	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
15	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 27	
	gасасасаса сисасасаса саса	24
20	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
30	<223> фосфотриоатный скелет	
	<400> 28	
	иииииииии иииииииии	20
35	<210> 29	
	<211> 24	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 29	
	gасасасаса сасасасаса саси	24
45	<210> 30	
	<211> 24	
	<212> РНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
50	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 30	
	gасасасаса сасасасаса сиии	24

	<210>	31	
	<211>	20	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
5	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	31	
		uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	20
10	<210>	32	
	<211>	20	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
15	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	32	
		uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	20
20	<210>	33	
	<211>	20	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
25	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(20)	
30	<223>	фосфоротиоатный скелет	
	<400>	33	
		uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	20
35	<210>	34	
	<211>	14	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
40	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	34	
		uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	14
45	<210>	35	
	<211>	16	
	<212>	РНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
50	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	35	
		uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	16

<210> 36
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

5 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 36
 tccatgacgt tccatgacgtt

20

10

Формула изобретения

1. Иммуностимулирующий олигорибонуклеотид, выбранный из:

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G или
 A*A*A*C*G*C*U*C*A*G*C*C*A*A*A*G*C*A*G;

15 где - означает фосфодиэфирный скелет, и * означает фосфоротиоатный скелет.

2. Иммуностимулирующая композиция, содержащая одноцепочечный
 иммуностимулирующий олигорибонуклеотид, выбранный из:

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G или
 A*A*A*C*G*C*U*C*A*G*C*C*A*A*A*G*C*A*G;

20

и носитель для доставки, где указанный носитель для доставки представляет собой катионный липид, и где - означает фосфодиэфирный скелет, и * означает фосфоротиоатный скелет.

3. Способ индукции продукции интерферона-альфа, включающий приведение
 25 иммунной клетки, способной продуцировать интерферон-альфа, в контакт с одноцепочечным иммуностимулирующим олигорибонуклеотидом, выбранным из:

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G или
 A*A*A*C*G*C*U*C*A*G*C*C*A*A*A*G*C*A*G;

30

в количестве, эффективном для индукции терапевтически значимой продукции интерферона-альфа, и где - означает фосфодиэфирный скелет, и * означает фосфоротиоатный скелет.

4. Способ по п.3, где способ осуществляют in vivo.

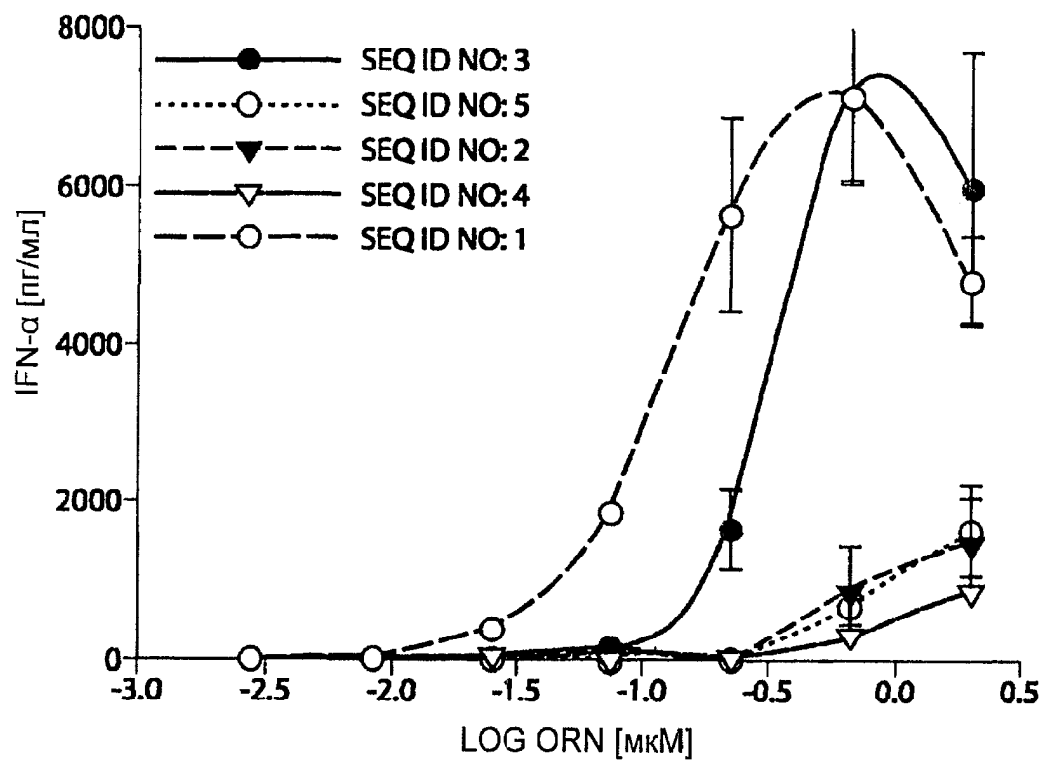
5. Применение одноцепочечного иммуностимулирующего полимера, выбранного
 35 из:

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G или
 A*A*A*C*G*C*U*C*A*G*C*C*A*A*A*G*C*A*G;

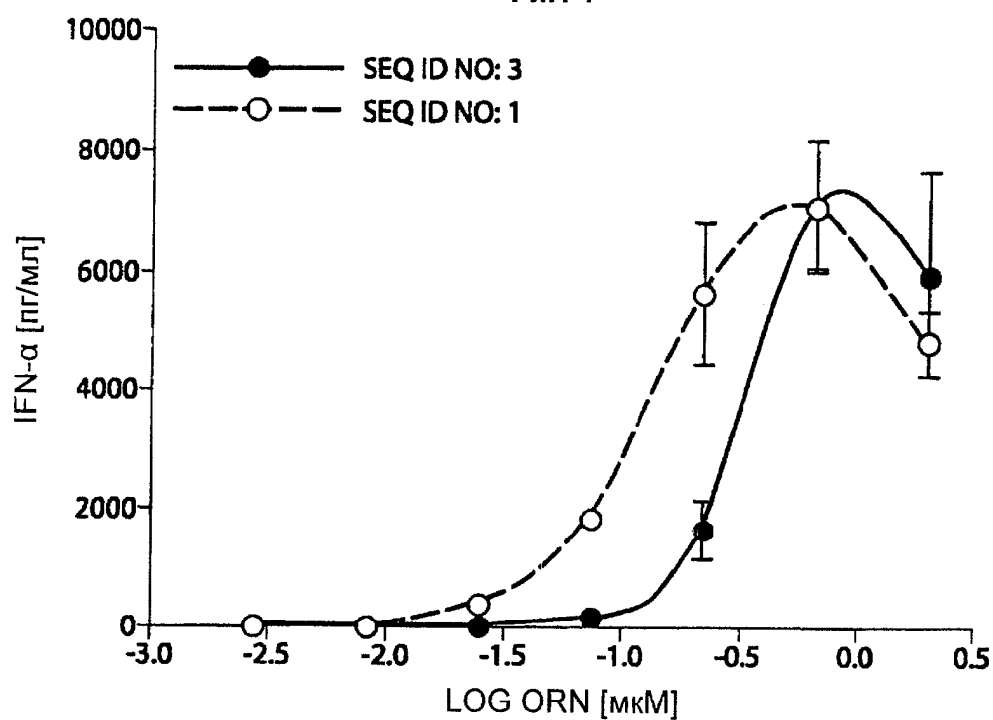
где - означает фосфодиэфирный скелет, и * означает фосфоротиоатный скелет, в
 40 изготовлении лекарственного средства для лечения аллергического состояния, инфекционного заболевания или рака.

45

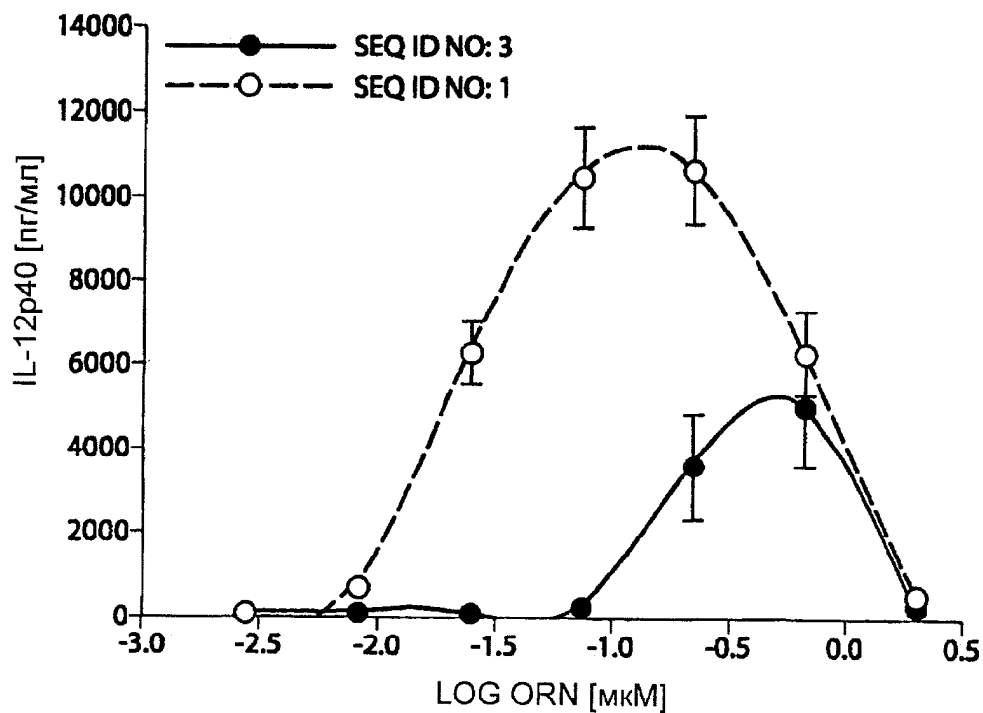
50



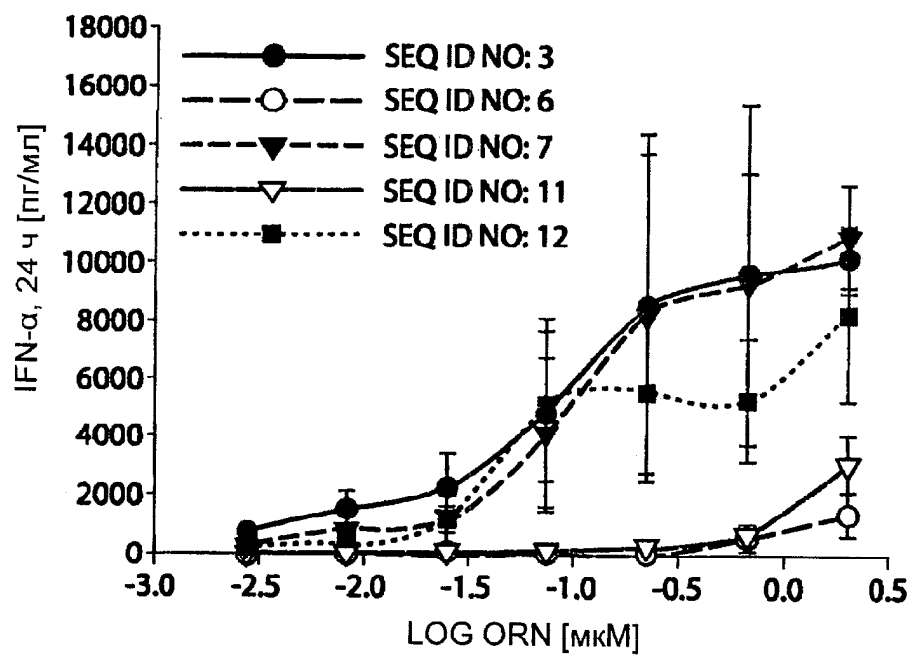
Фиг. 1



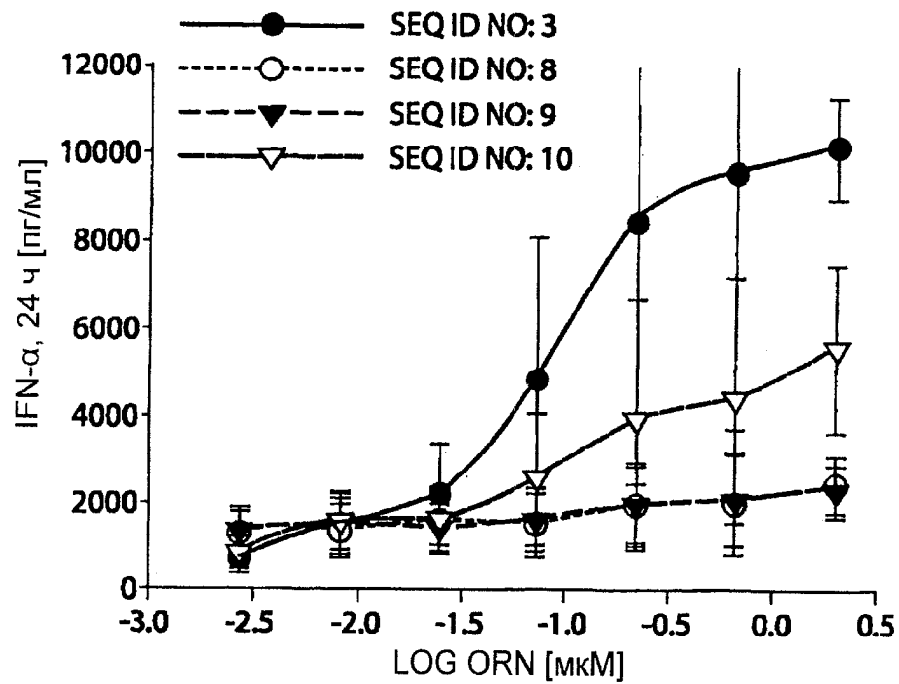
Фиг. 2А



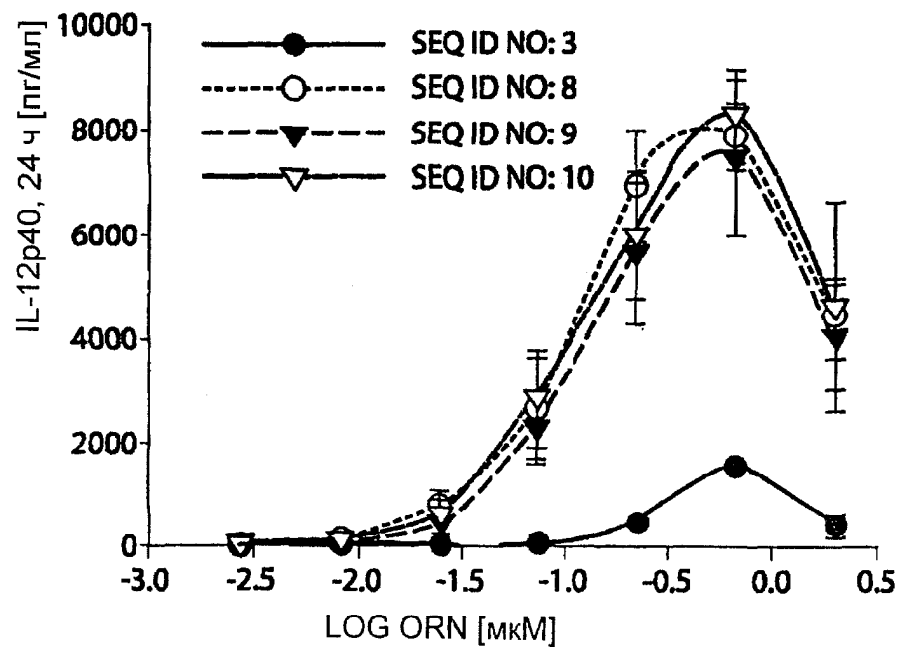
Фиг. 2В



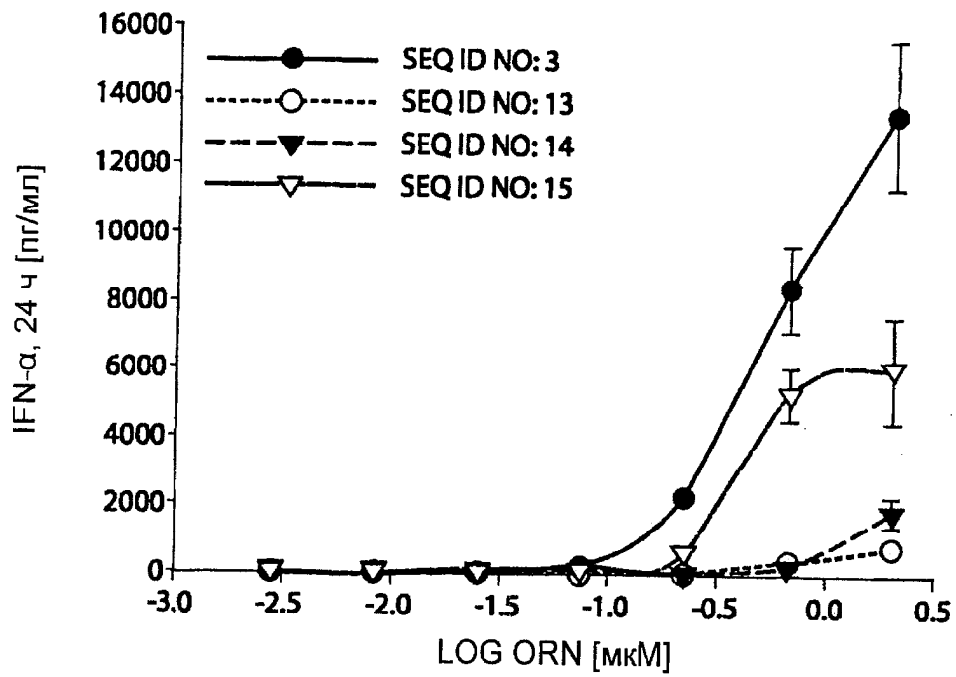
Фиг. 3



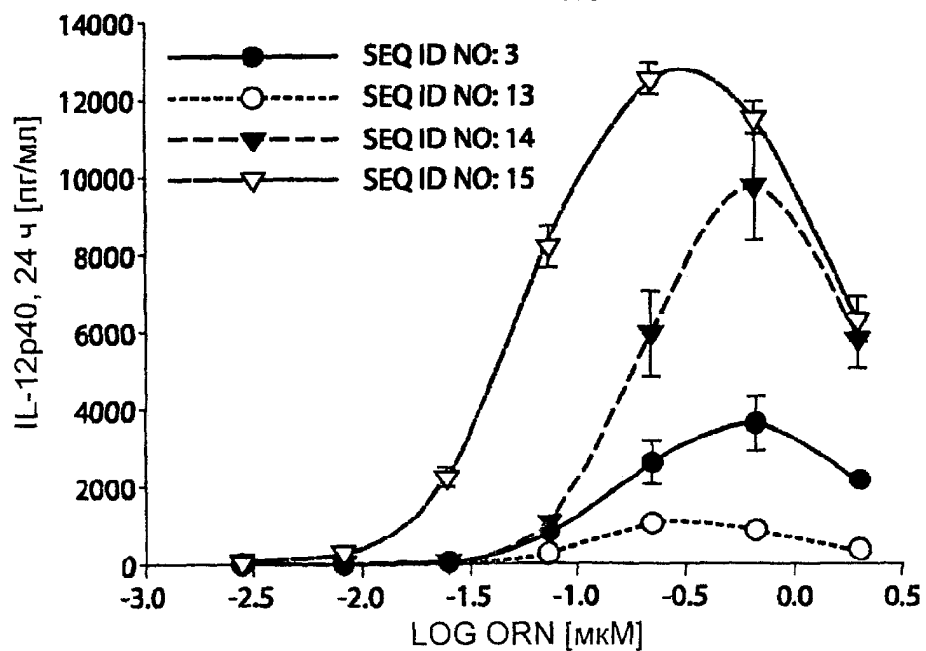
Фиг. 4А



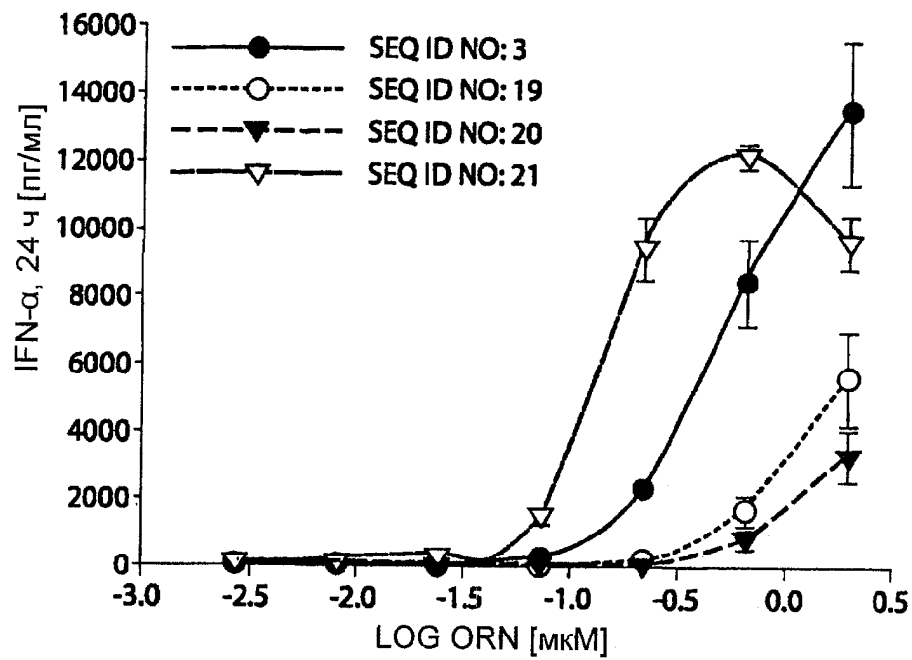
Фиг. 4В



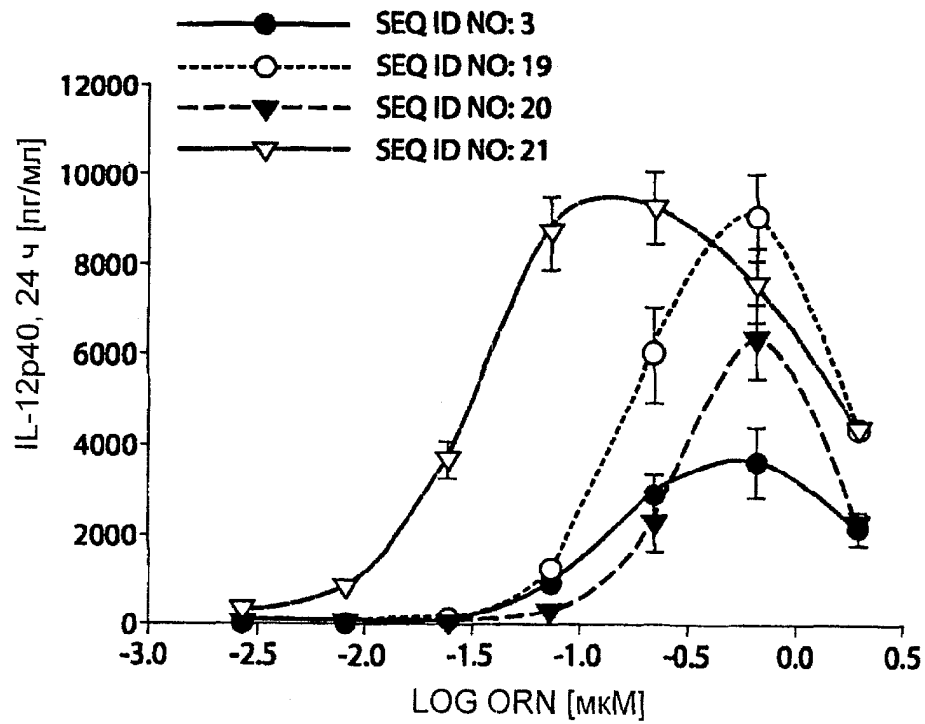
Фиг. 5А



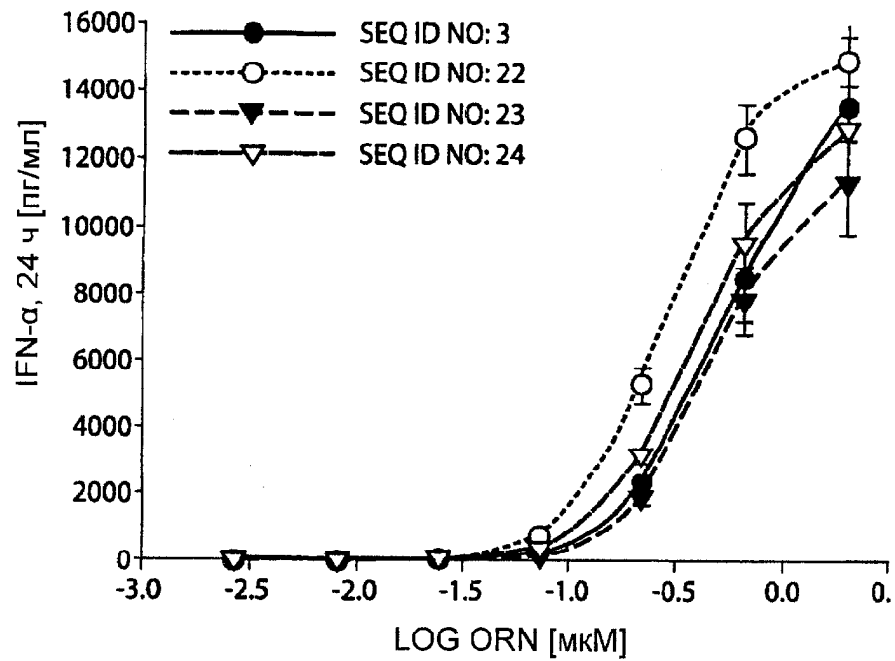
Фиг. 5В



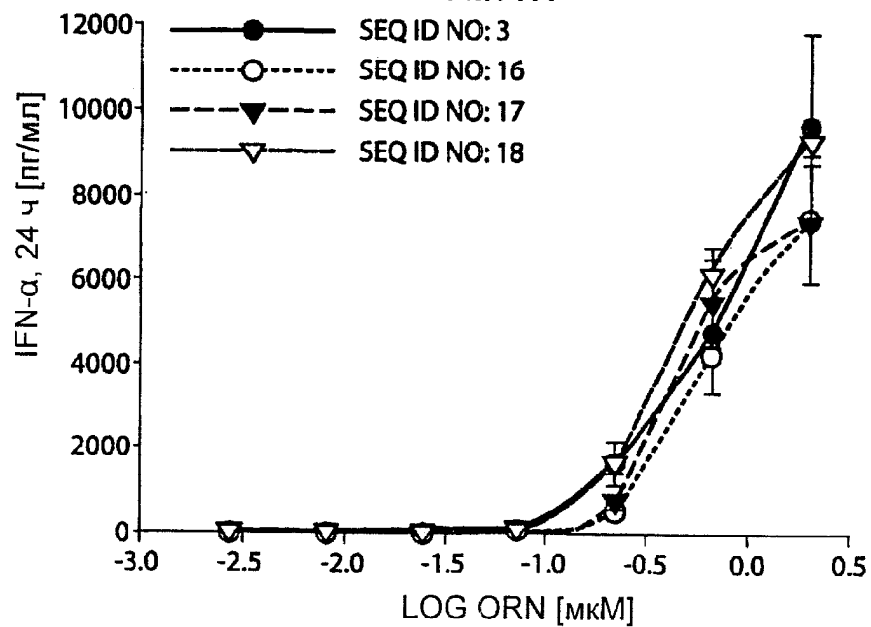
Фиг. 6А



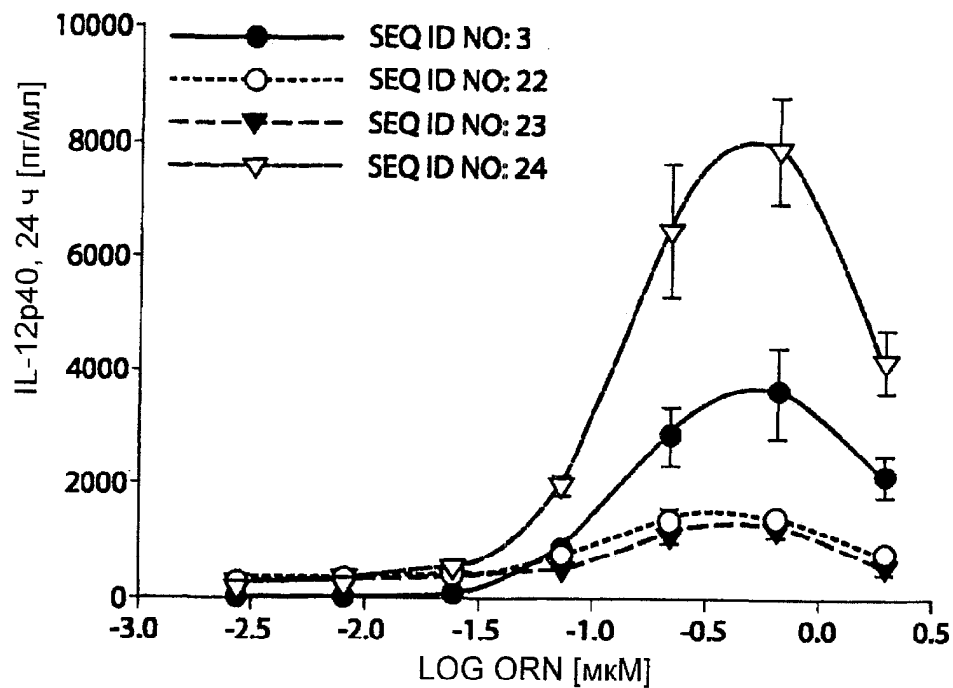
Фиг. 6В



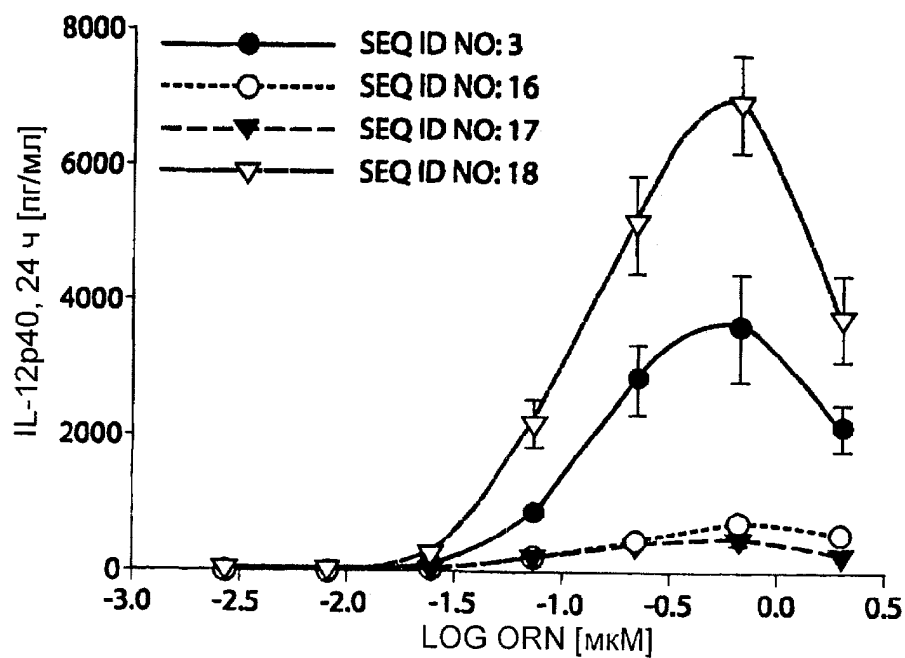
Фиг. 7А



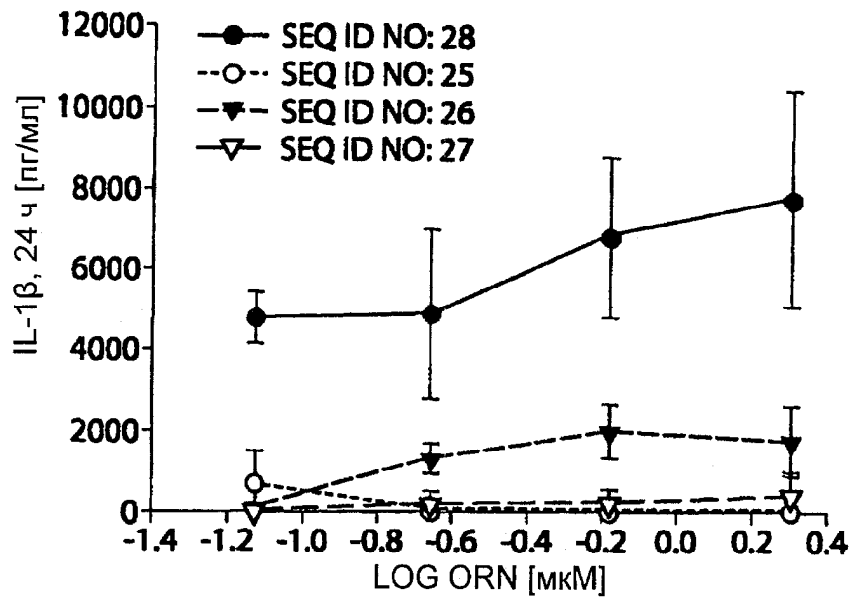
Фиг. 7В



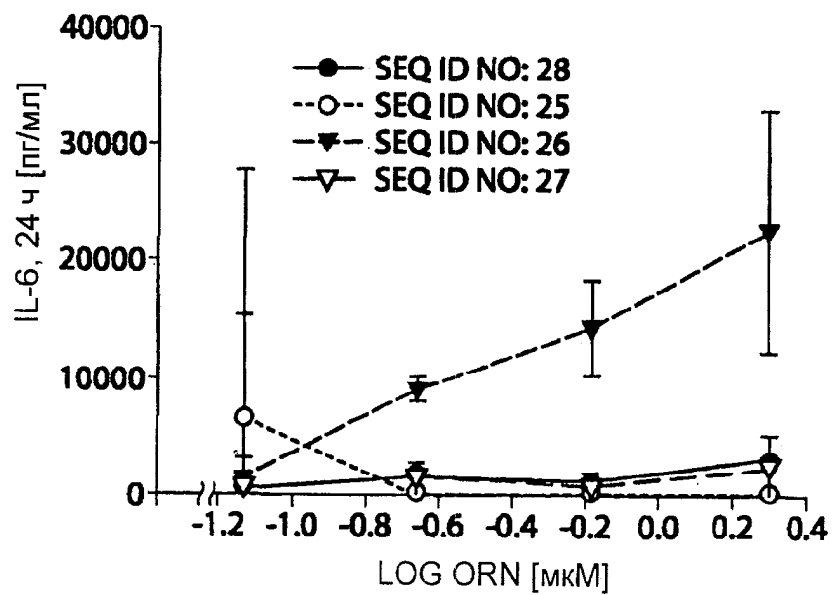
Фиг. 7С



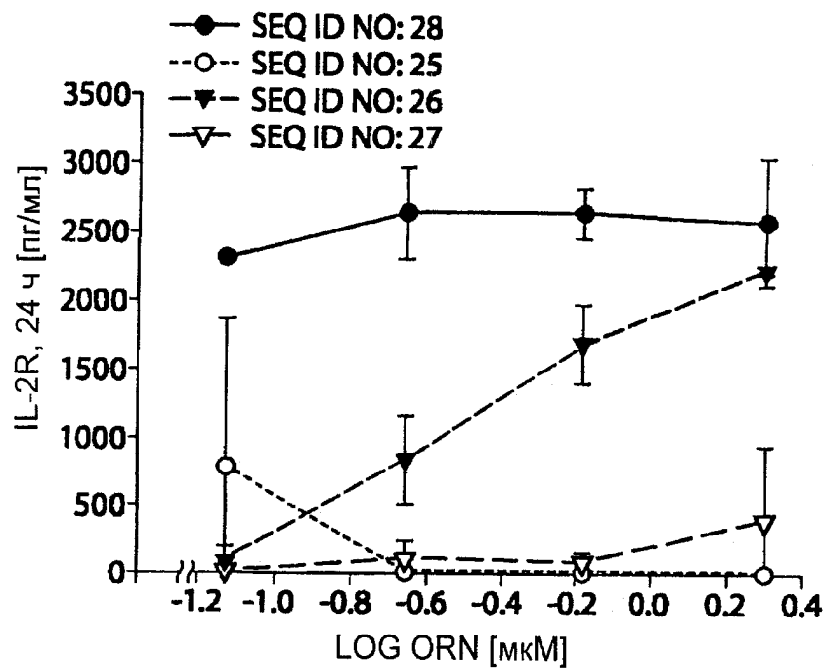
Фиг. 7D



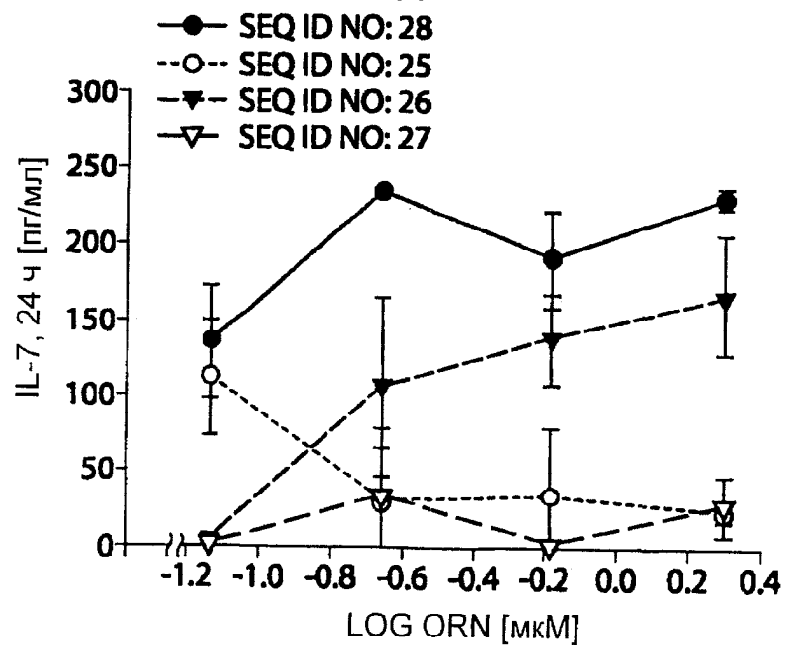
Фиг. 8А



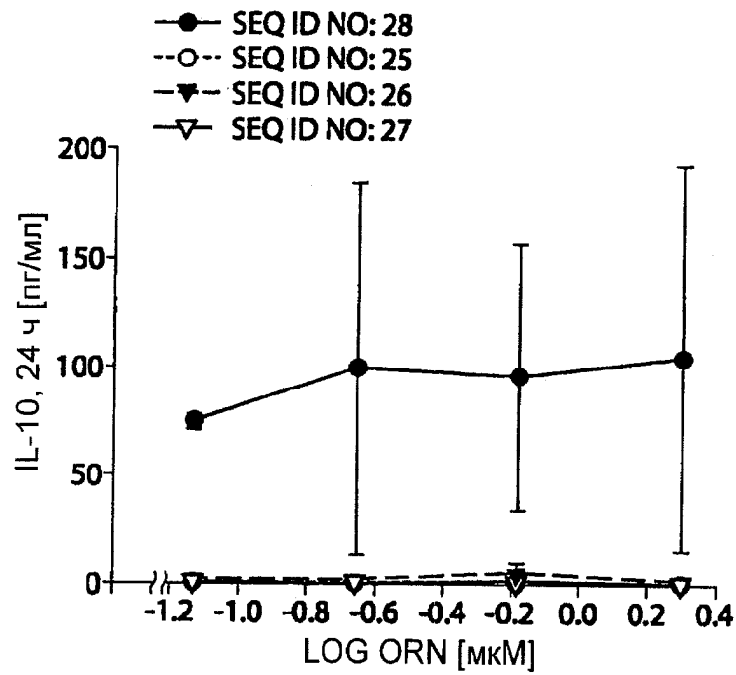
Фиг. 8В



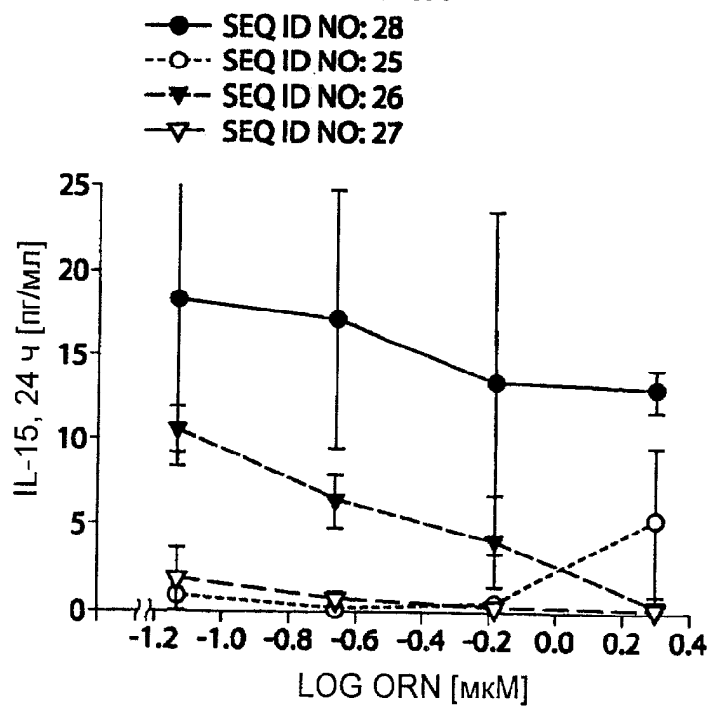
Фиг. 8C



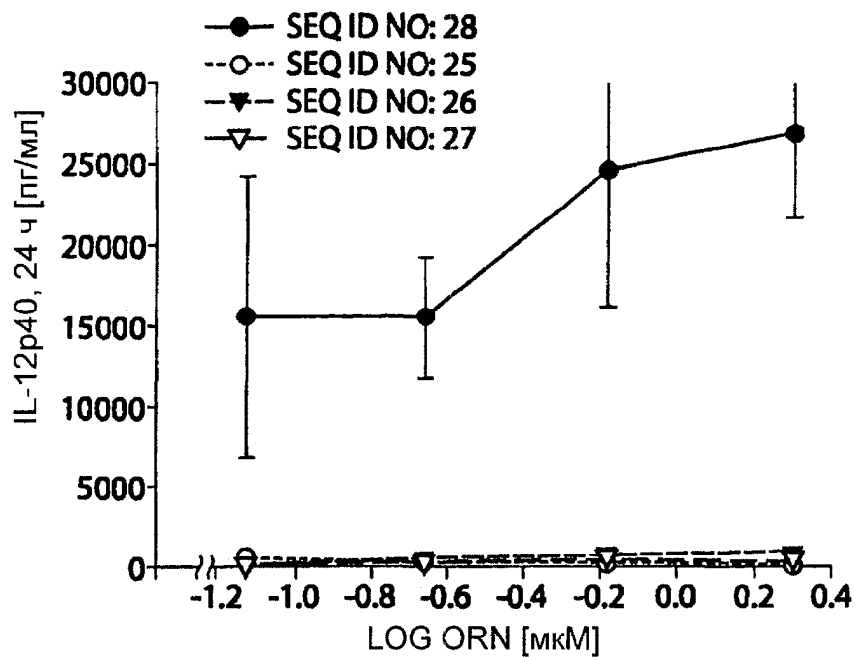
Фиг. 8D



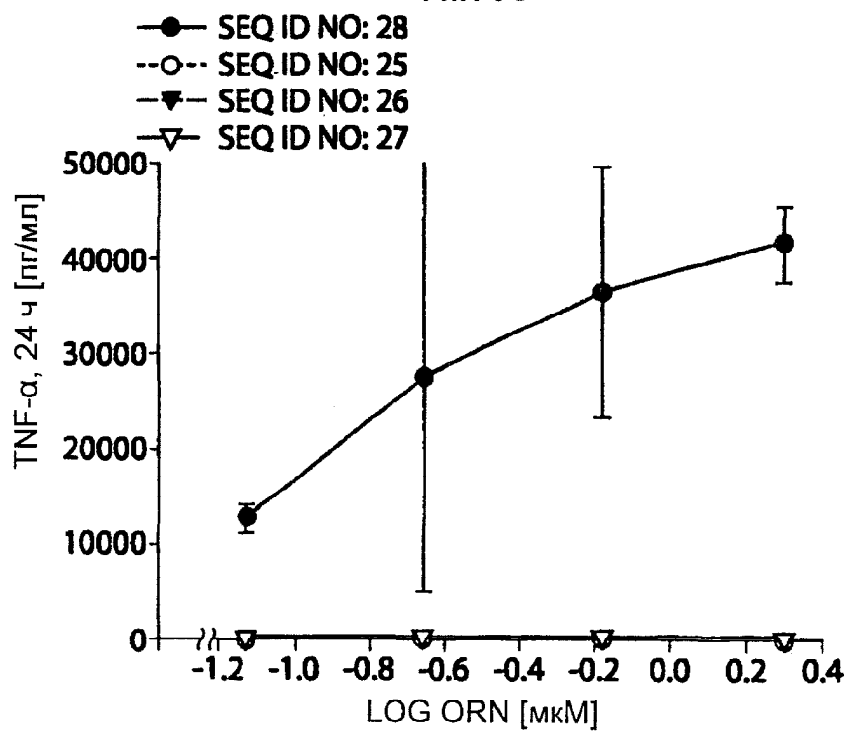
Фиг. 9А



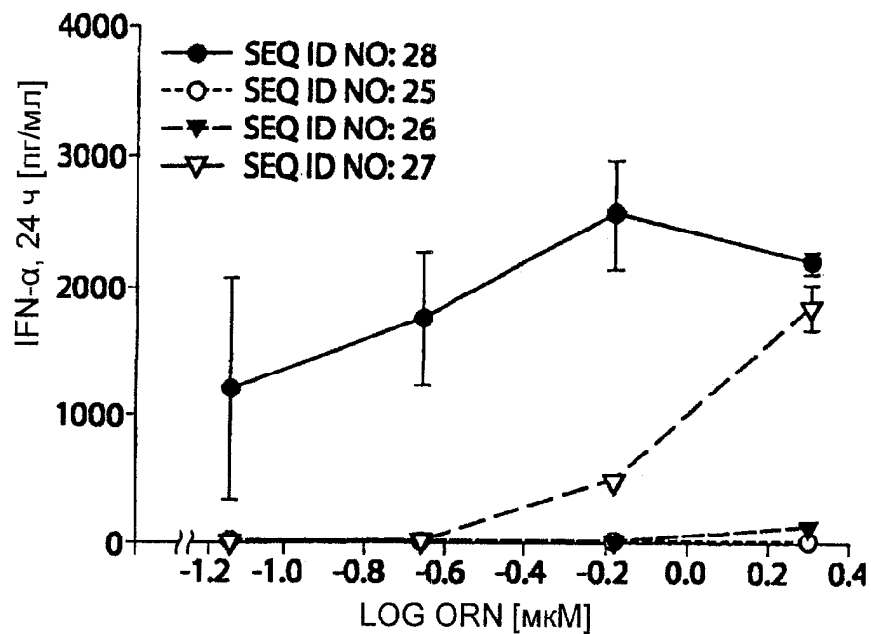
Фиг. 9В



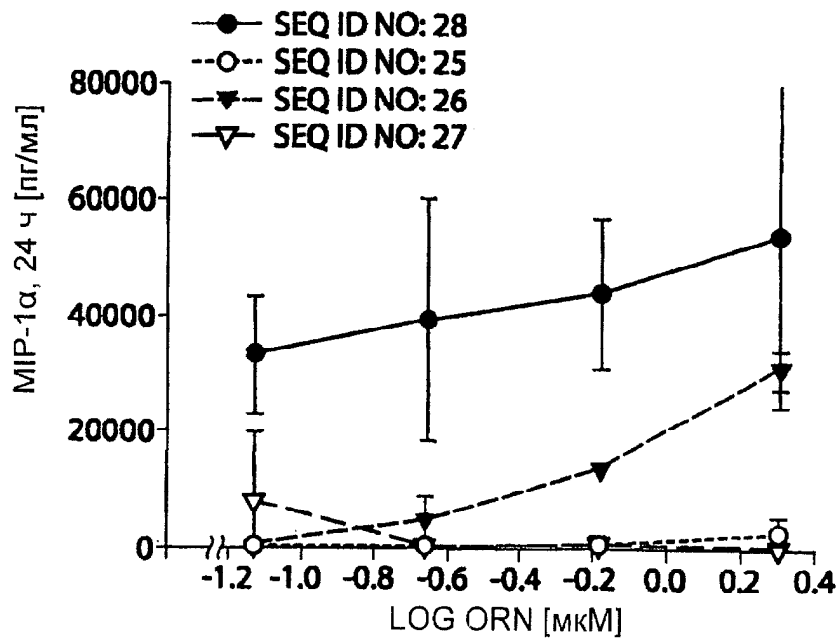
Фиг. 9С



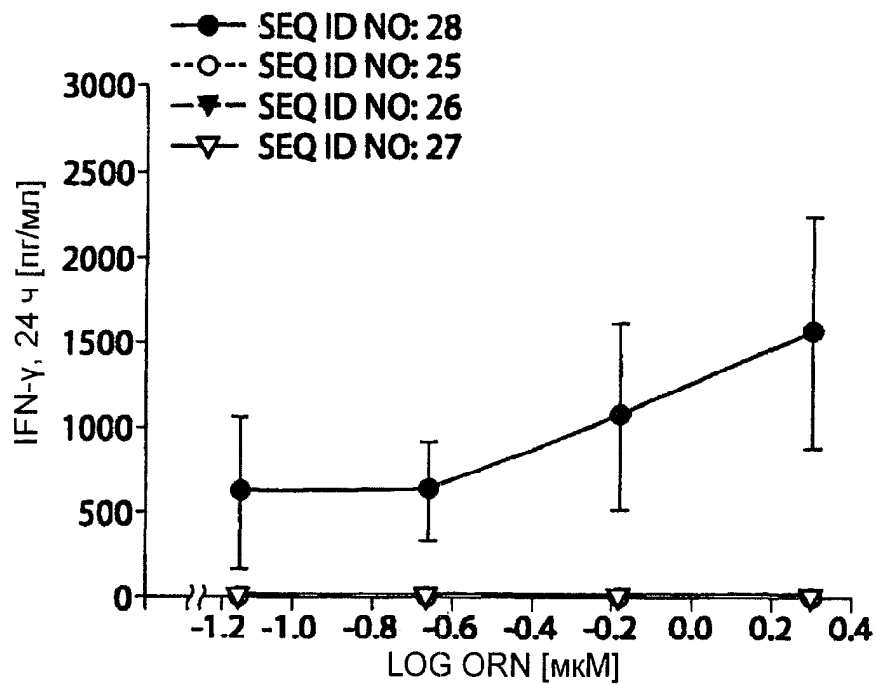
Фиг. 9D



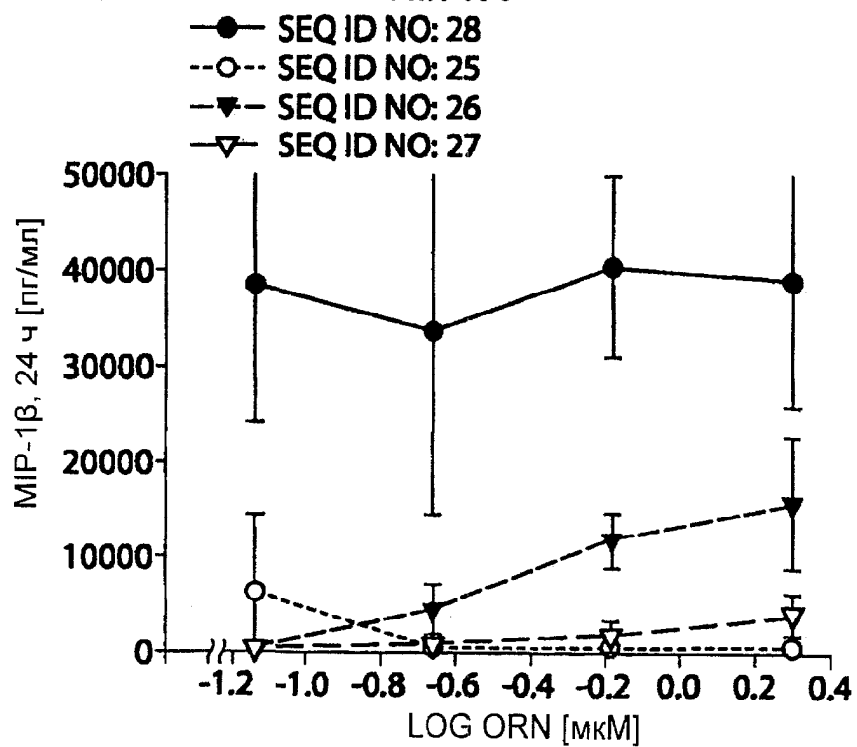
Фиг. 10А



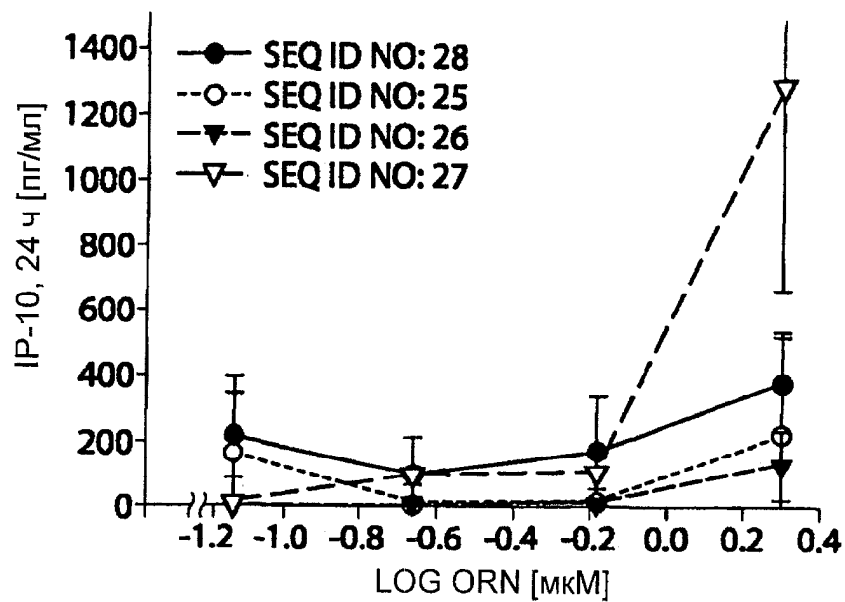
Фиг. 10В



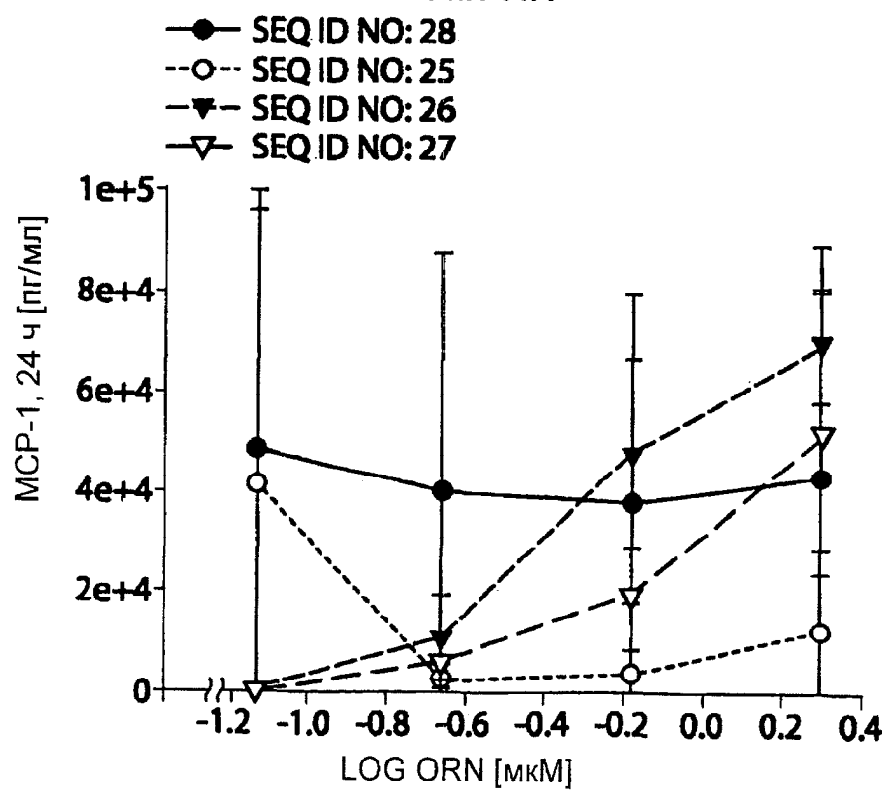
Фиг. 10С



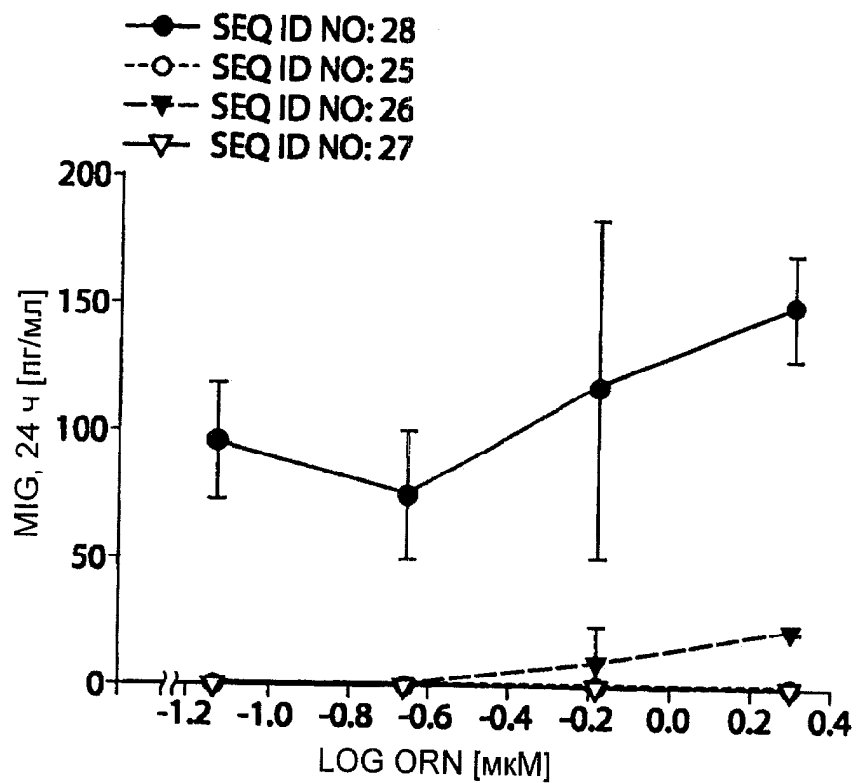
Фиг. 10D



Фиг. 11А

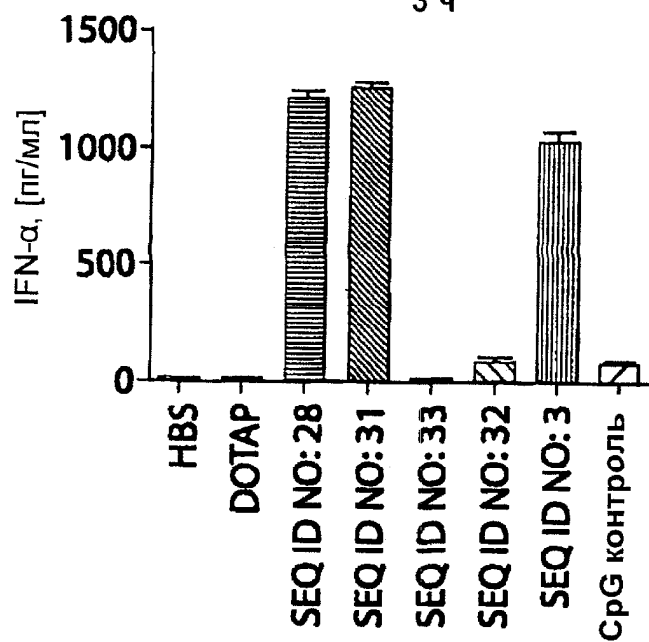


Фиг. 11В

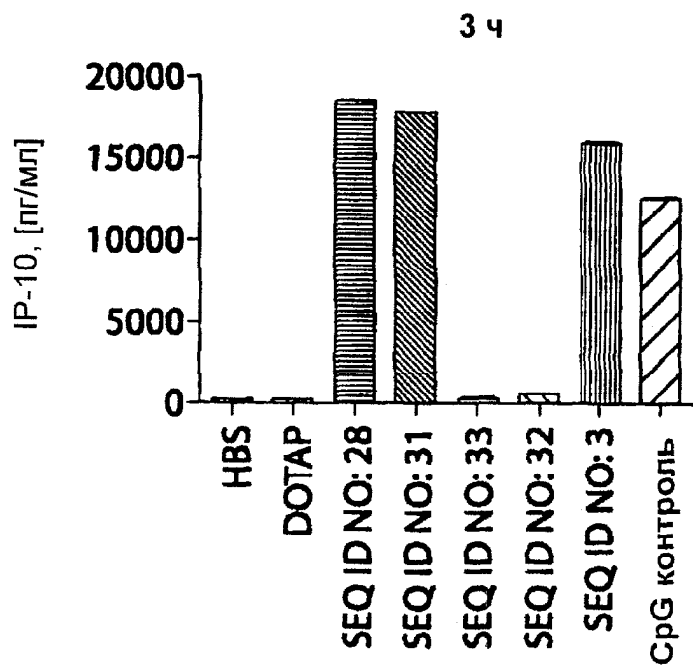


Фиг. 11С

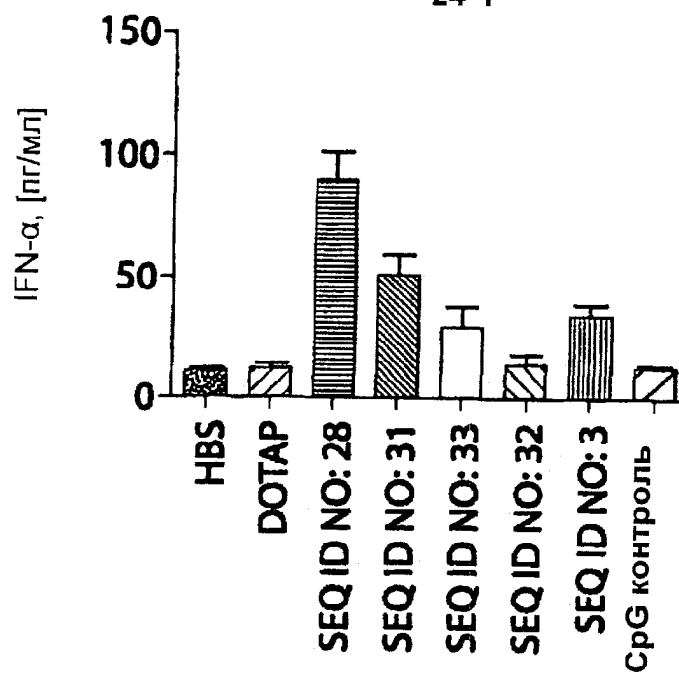
3 ч



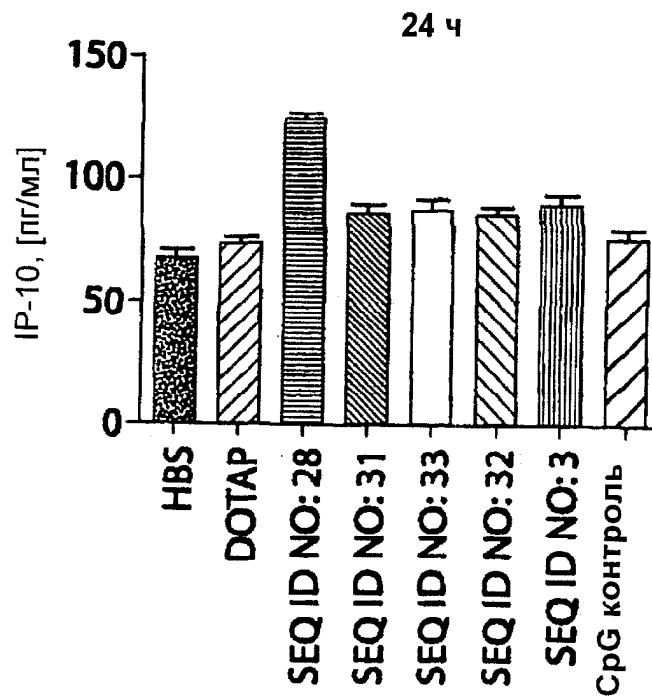
Фиг. 12А



Фиг. 12В
24 ч

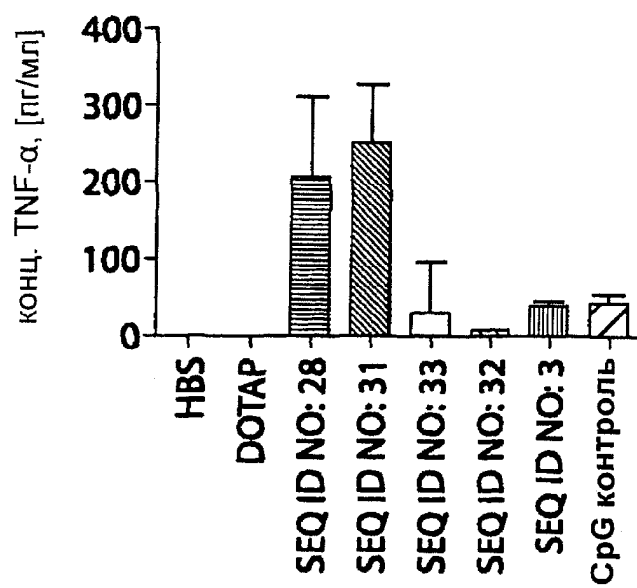


Фиг. 12С

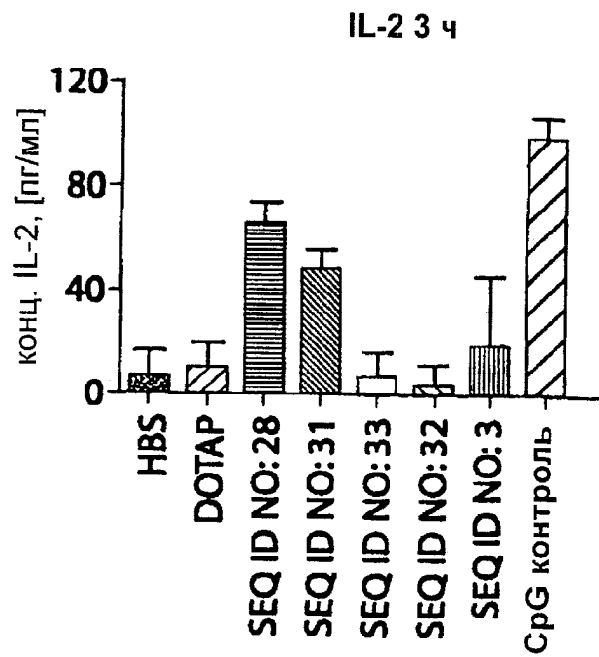


Фиг. 12D

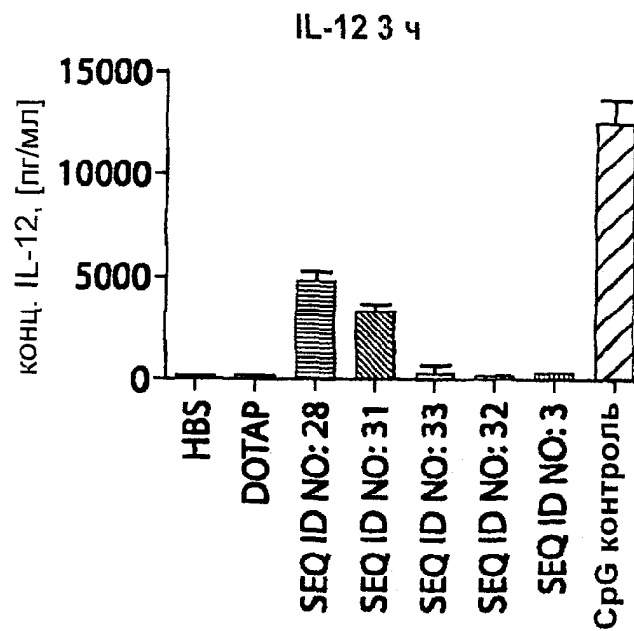
TNF- α 3 ч



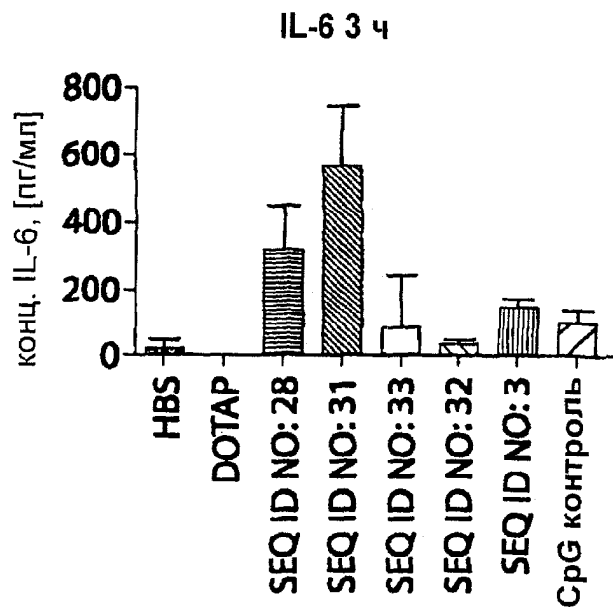
Фиг. 13A



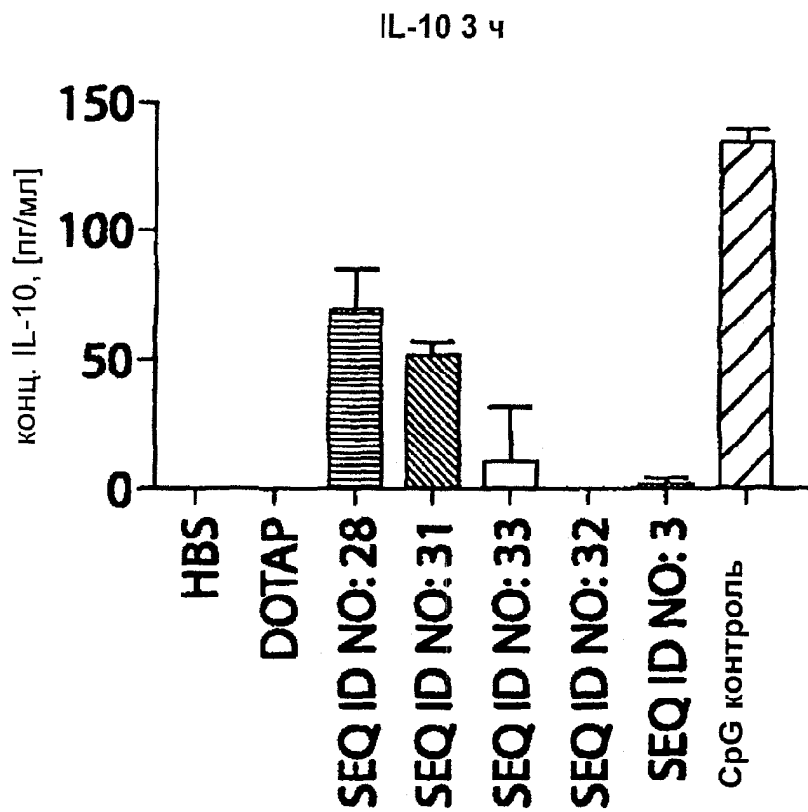
Фиг. 13В



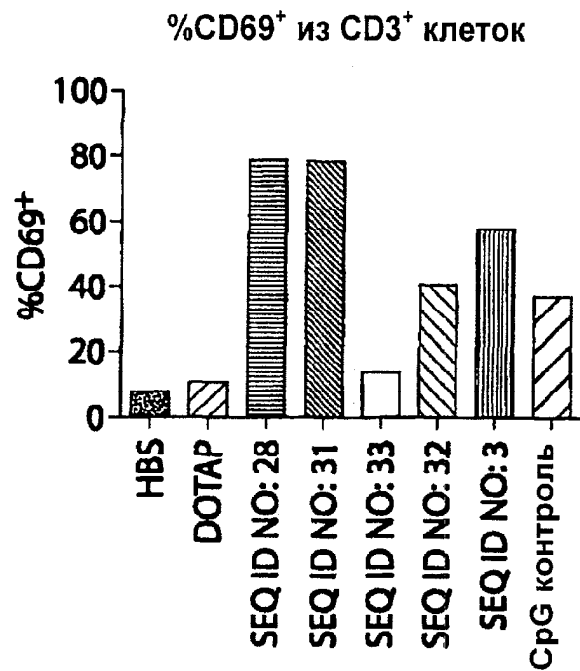
Фиг. 13С



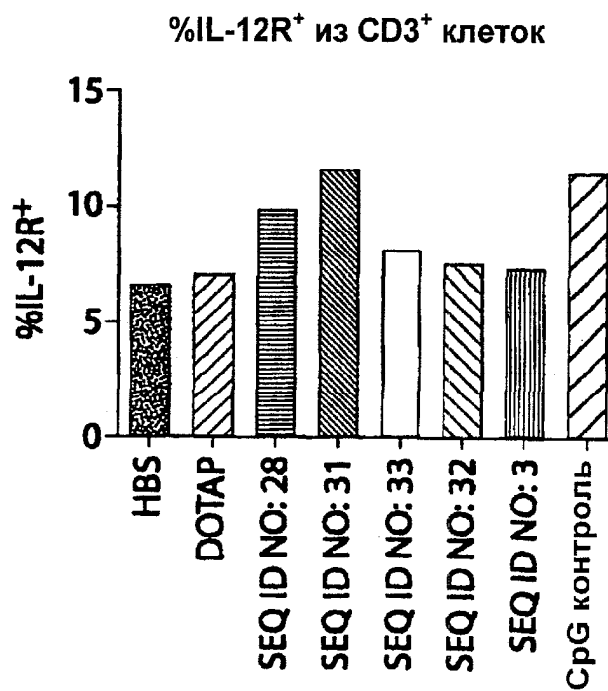
Фиг. 13D



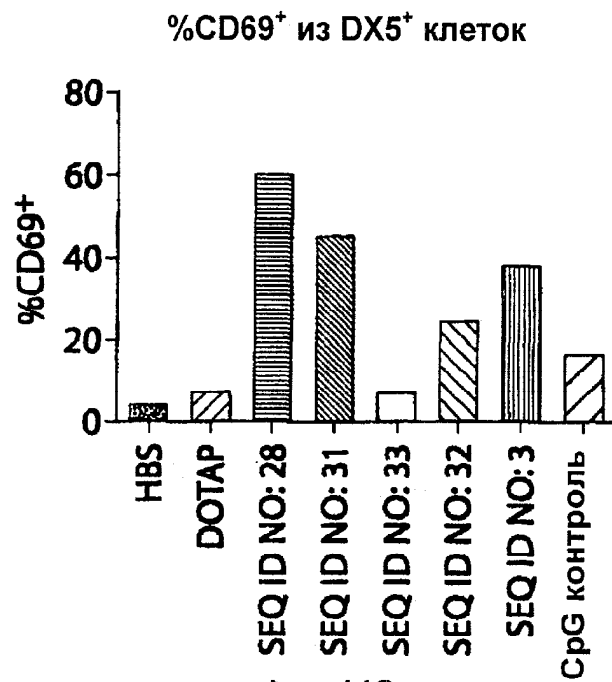
Фиг. 13E



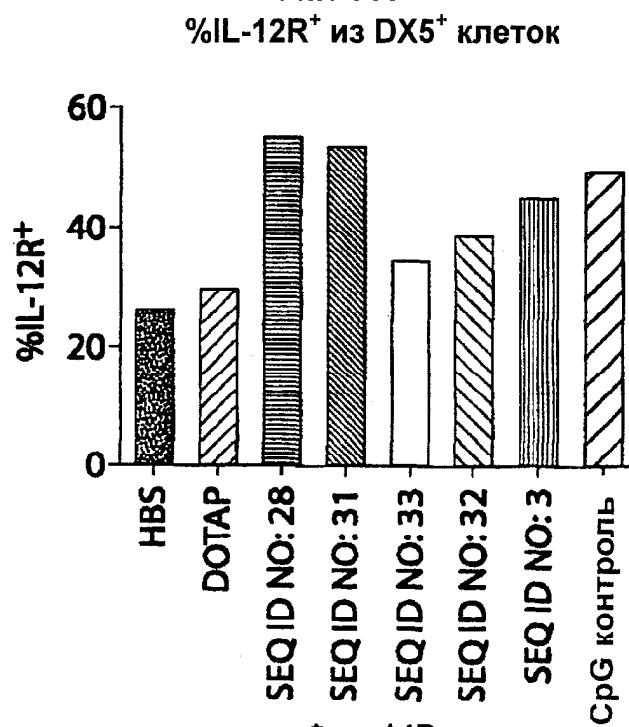
Фиг. 14А



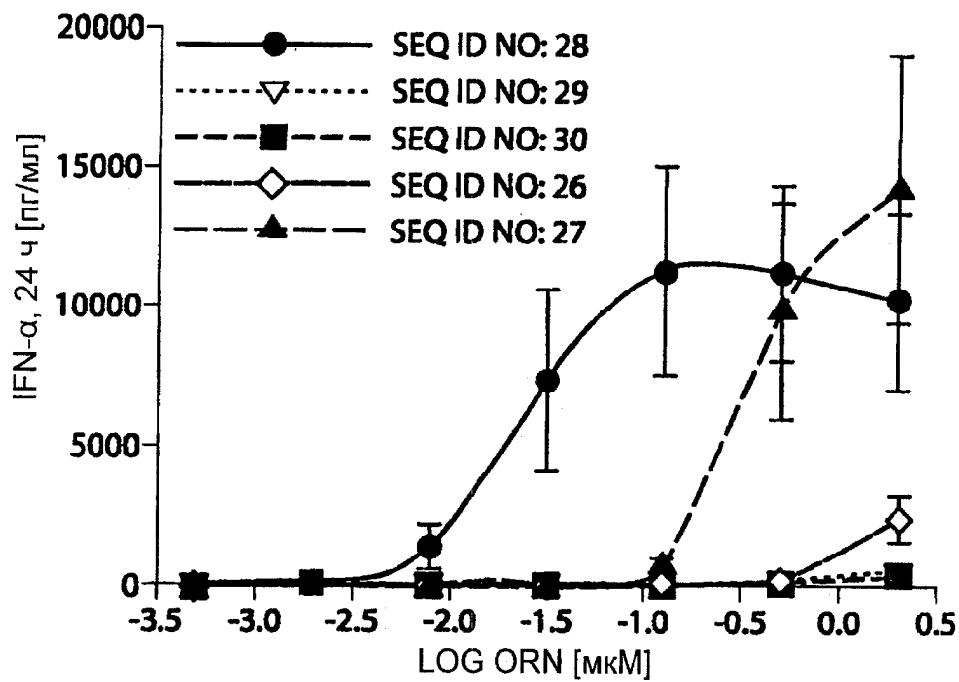
Фиг. 14В



Фиг. 14C

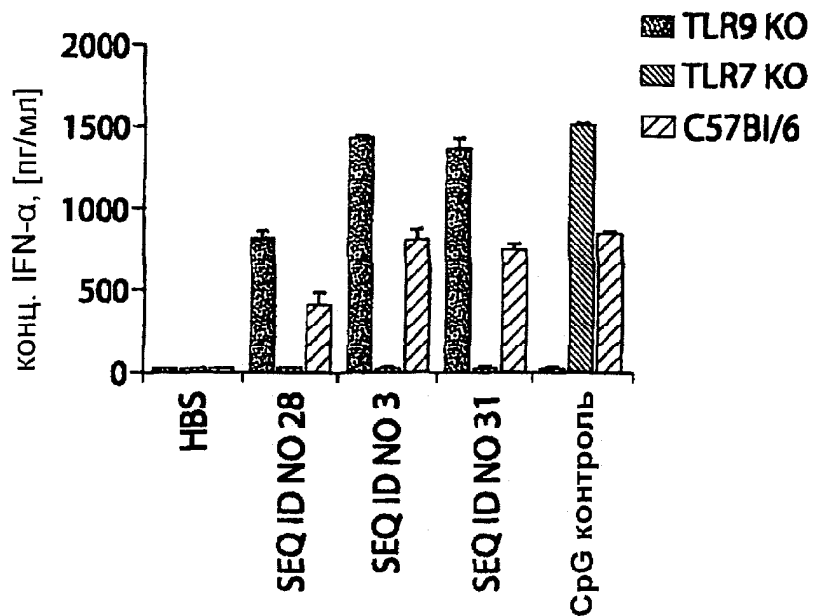


Фиг. 14D

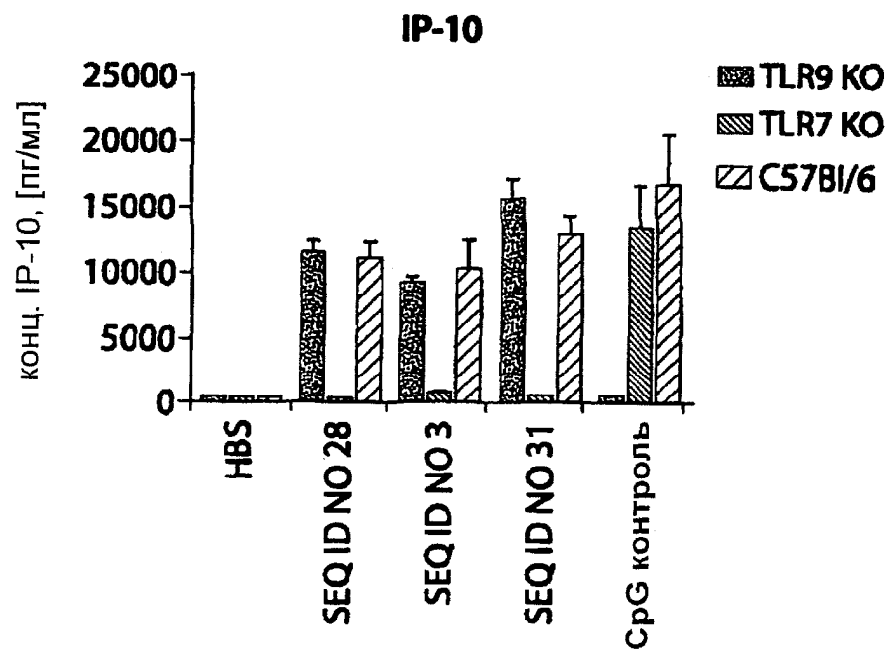


Фиг. 15

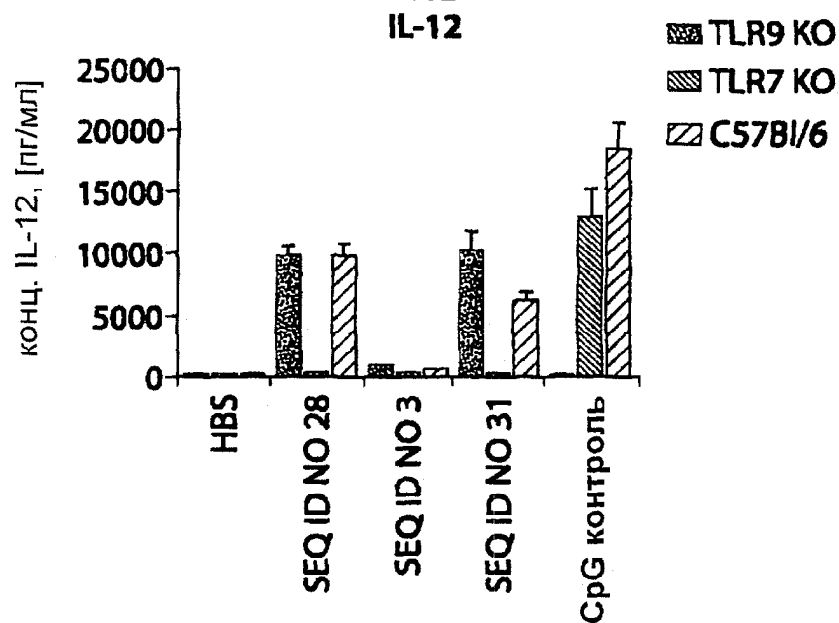
IFN-α



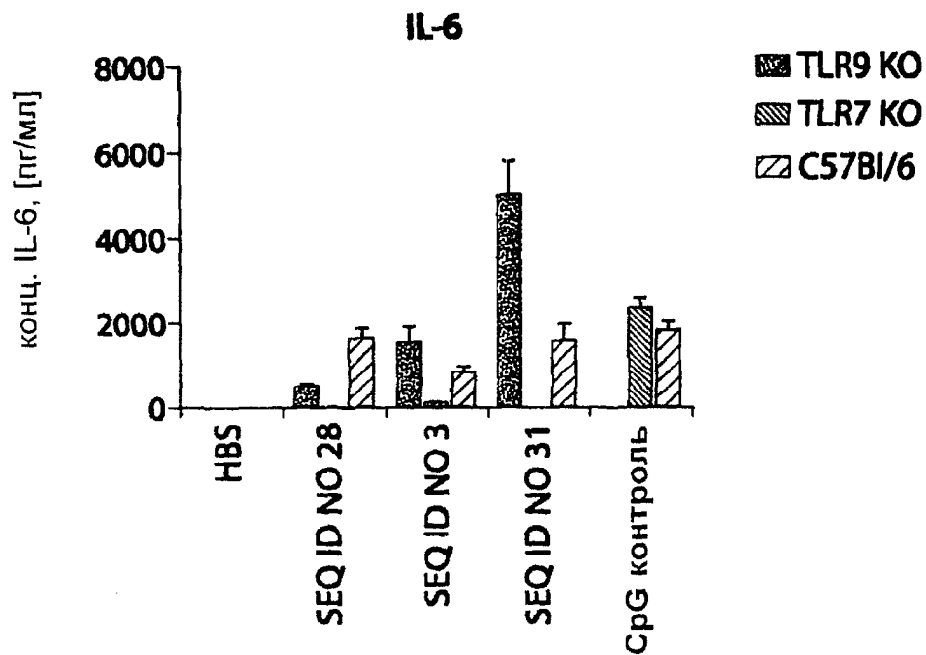
Фиг. 16А



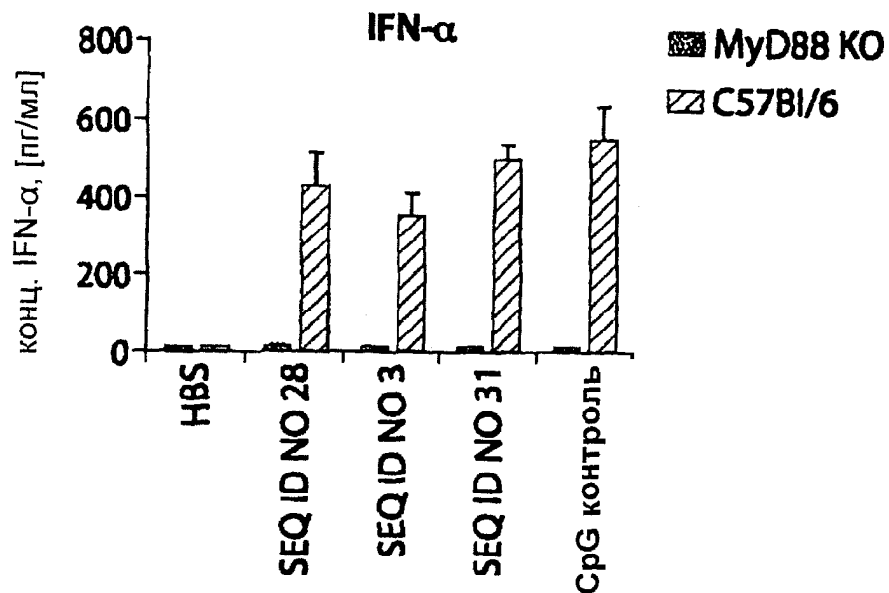
Фиг. 16B



Фиг. 16C



Фиг. 16D



Фиг. 17A

