

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044566**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.09.06**

(21) Номер заявки  
**202190546**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.09.26**

(51) Int. Cl. **A61K 35/74** (2015.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 1/36** (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ БАКТЕРИЙ**

---

(31) **62/737,762**

(32) **2018.09.27**

(33) **US**

(43) **2021.09.10**

(86) **PCT/US2019/053289**

(87) **WO 2020/069211 2020.04.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ИНДАПТУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
**(US)**

(72) Изобретатель:  
**Ньюман Майкл Дж. (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) **US-A1-20160228523**  
**US-A1-20170348383**  
**US-B1-6548287**

(57) Настоящее изобретение в целом относится к композициям, дозированным формам и способам профилактики и лечения инфекций. Композиции содержат интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки, которые были обработаны для снижения активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина, которые неожиданно обладают повышенной активностью в отношении запуска продукции цитокинов иммунными клетками.

**B1**

**044566**

**044566**

**B1**

Данная заявка испрашивает приоритет согласно Кодексу США, раздел 35, §119, на основании предварительной заявки на патент США № 62/737,762, поданной 27 сентября 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

#### **Уровень техники**

Для вирусных инфекций, таких как гепатит В (HBV) и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), существующая терапия может контролировать репликацию вируса, улучшать клиническое состояние у большинства получающих лечение пациентов и приводить к снижению смертности и заболеваемости. Однако противовирусной терапии препятствует возобновление виремии после прекращения лечения и появление мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости. Большинство пациентов нуждаются в пожизненном лечении, и излечение от хронической инфекции HBV или ВИЧ достигается редко.

Известно, что цитокины и хемокины играют важную роль в защите хозяина от широкого спектра вирусных инфекций, включая гепатит и ВИЧ. Интерферон-альфа (IFN- $\alpha$ ) одобрен для лечения инфекции гепатита В, и несколько дополнительных цитокинов, включая интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-23 (IL-23), ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) вовлечены в защиту организма-хозяина от вирусных инфекций, таких как гепатит и ВИЧ, или в их лечение.

Профилактическая вакцинация против патогенов требует предоставления антигенной детерминанты из патогена и адъюванта, который обеспечивает сигналы опасности для иммунной системы или их последующие эффекторы, необходимые для активации иммунного ответа против антигена патогена. Терапевтические вакцины, предназначенные для лечения уже существующей инфекции, зависят от распознавания хозяином антигенных детерминант патогена при существующей инфекции, а также требуют адъювантов или их последующих эффекторов для обеспечения опосредованной сигналом опасности иммунной активации. В некоторых случаях возможно усилить терапевтические вакцины путем предоставления антигенов, происходящих из экзогенных патогенов. Иммунные клетки как врожденной, так и адаптивной иммунной системы используют паттерн-распознающие рецепторы (PRR), чтобы воспринимать опасность в виде патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP). Наиболее известное семейство PRR состоит из толл-подобных рецепторов (TLR), обнаруженных практически на всех иммунных клетках. Эти рецепторы (TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9) реагируют на продукты, обнаруженные во многих различных типах патогенов, включая бактерии и вирусы. Активация рецепторов TLR приводит как к прямой, так и к косвенной активации функции иммунных клеток и иммунных ответов. Прямая активация происходит за счет стимулирования созревания, пролиферации и дифференцировки клеток, тогда как косвенная активация происходит за счет индукции секреции цитокинов и хемокинов. Десятый TLR (TLR10) может действовать как негативный регуляторный эффектор иммунной функции.

Из-за роли TLR в опосредованных хозяином иммунных ответах против патогенов были предприняты значительные усилия для получения адъювантов агонистов TLR и терапевтических средств для лечения инфекций. Широкий спектр моноспецифичных, очищенных или синтетических агонистов TLR был получен и протестирован в доклинических и клинических условиях. Агонисты TLR используют в качестве адъювантов в профилактических вакцинах. Однако, хотя активность в отношении патогенов наблюдали в условиях терапевтического применения вакцины, на пути этих усилий встретились значительные проблемы. Возникшие проблемы включали как недостаточную эффективность, так и чрезмерную токсичность, что указывает на необходимость дальнейших улучшений в профилактике и, в частности, лечении существующих инфекций с помощью агонистов TLR.

#### **Краткое описание изобретения**

В связи с необходимостью активации как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа для оптимальной иммунной защиты, и в связи с тем фактом, что патогены содержат несколько агонистов TLR и другие компоненты, связанные с сигналами опасности, предполагается, что для оптимальной противoinфекционной, в том числе противовирусной, терапии необходим терапевтический подход с использованием нескольких агонистов TLR. Известно, что грамотрицательные бактерии содержат несколько агонистов TLR и вызывают значительные иммунные ответы, связанные с агонистами TLR, включая секрецию цитокинов. Однако грамотрицательные бактерии дикого типа, которые содержат высокие уровни агониста TLR-4 липополисахарида (ЛПС) или эндотоксина, являются высокотоксичными при внутривенном введении, в основном из-за индукции чрезмерной секреции цитокинов иммунными клетками. Грамотрицательные бактерии также содержат агонисты TLR 1/2, 5 и 9, которые могут способствовать как стимуляции иммунной системы, так и системной токсичности.

В основе настоящего изобретения лежит удивительное и неожиданное обнаружение того, что обработка грамотрицательных бактерий для снижения их активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина, например, полимиксином и глутаральдегидом, которая может убить бактерии, сохранять бактерии интактными и значительно снижать уровни ЛПС, может в то же время увеличивать способность бактерий индуцировать секрецию цитокинов иммунными клетками человека. Это неожиданно по меньшей мере потому, что предполагалось, что значительное снижение ЛПС должно также привести к значительному снижению количества каждого из нескольких цитокинов, высвобождаемых иммунными клетками, подвергнутыми воз-

действию обработанных бактерий, по сравнению с необработанными бактериями дикого типа.

Неожиданно, как показано в табл. 1, обработанные бактерии индуцировали более высокие уровни 8 из 9 цитокинов, секретируемых иммунными клетками человека, по сравнению с необработанными бактериями дикого типа, при тестировании при тех же концентрациях (необработанных и обработанных) бактерий, несмотря на тот факт, что обработанные бактерии имели только 4,94% от уровня ЛПС, присутствующего в необработанных бактериях. Кроме того, несмотря на значительное снижение ЛПС, обработанные бактерии индуцировали более высокие уровни цитокинов, чем моноспецифичные агонисты TLR (Табл. 2). Снижение активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина в результате обработки, которое может составлять приблизительно 75-99% при измерении с помощью анализа с лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ) *in vitro* по сравнению с необработанными бактериями дикого типа, может привести к снижению токсичности. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что интактная структура обработанных бактериальных клеток может помочь предотвратить или минимизировать высвобождение свободного ЛПС в некоторые компартменты субъекта-хозяина. Результаты дают основания полагать, что обработанные бактерии могут вызывать лучший иммунный ответ, чем необработанные бактерии или моноспецифичные агонисты, со сниженной системной токсичностью по сравнению с необработанными бактериями.

Исследования на животных также подтвердили, что такие обработанные бактерии могут ингибировать существующие вирусные инфекции как HBV, так и ВИЧ. Кроме того, по сравнению со стандартом оказания медицинской помощи (например, энтекавиром для HBV) обработанные бактерии проявляли устойчивый и значительный ингибирующий эффект спустя долгое время после прекращения лечения, даже несмотря на то, что проявление первоначального ингибирующего эффекта может занять больше времени. Также интересно, что даже несмотря на то, что лечение НПВП (например, индометацином) по отдельности не показало наблюдаемых противовирусных эффектов, комбинация с НПВП может синергически повысить эффективность обработанных бактерий.

Соответственно, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ лечения инфекции у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества композиции, содержащей множество интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, которые были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина по меньшей мере на 75%.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ профилактики инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, содержащей множество интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, которые были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина по меньшей мере на 90%, и полученный из патогена или патоген-ассоциированный антиген.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ профилактики или лечения инфекции у нуждающегося в этом пациента. Указанный способ предусматривает введение указанному пациенту эффективного количества композиции, содержащей множество интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, которые были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина (активного ЛПС) на приблизительно 75-99% при измерении с помощью анализа с лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ) по сравнению с необработанными грамотрицательными бактериальными клетками дикого типа.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит приблизительно от 0,01 до 100 нг активного ЛПС на кг массы тела пациента. В некоторых вариантах реализации композиция содержит приблизительно от 0,02 до 20 нг активного ЛПС на кг массы тела пациента. В некоторых вариантах реализации композиция содержит приблизительно от 0,1 до 10 нг активного ЛПС на кг массы тела пациента.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит приблизительно от 2 до 200 нг активного ЛПС на  $1 \times 10^8$  клеток. В некоторых вариантах реализации композиция содержит приблизительно от 10 до 120 нг активного ЛПС на  $1 \times 10^8$  клеток. В некоторых вариантах реализации композиция содержит приблизительно от 20 до 100 нг активного ЛПС на  $1 \times 10^8$  клеток.

В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению уровня ЛПС-ассоциированного эндотоксина на приблизительно 85-98%. В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению уровня ЛПС-ассоциированного эндотоксина на приблизительно 90-98%.

В некоторых вариантах реализации инфекция представляет собой вирусную инфекцию, например, вызванную вирусом, выбранным из табл. А. В некоторых вариантах реализации вирусная инфекция вызвана вирусом гепатита В (HBV) или вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В одном из вариантов реализации также предложена фармацевтическая дозированная форма, со-

держащая множество интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, которые были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина на приблизительно 75-99% при измерении с помощью анализа с лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ) по сравнению с необработанными грамотрицательными бактериальными клетками дикого типа, где общая активность ЛПС-ассоциированного эндотоксина эквивалентна приблизительно от 0,7 нг до 7000 нг активного ЛПС, предпочтительно эквивалентна приблизительно от 7 нг до 1400 нг активного ЛПС.

В других вариантах реализации также описаны терапевтические композиции, вакцины и содержащие их дозированные формы.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1A-1D показаны эффекты лечения энтекавиром, обработанными бактериями (бактериями-имитацией) или их комбинацией в отношении ингибирования продукции ДНК HBV *in vivo*.

На фиг. 2 показано, что бактерии-имитация, но не энтекавир, снижали уровни HBeAg *in vivo*.

На фиг. 3A-D показаны результаты более длительного исследования ингибирования продукции ДНК HBV *in vivo*.

На фиг. 4A-D представлены результаты ингибирования экспрессии HBeAg *in vivo*.

На фиг. 5A-D представлены результаты ингибирования экспрессии HBeAg *in vivo*.

На фиг. 6 показано, что комбинация индометацина и бактерий-имитации (с энтекавиром или без него) ингибировала экспрессию HBeAg в печени мышей через 27 недель после прекращения лечения.

На фиг. 7A-F представлен иммуногистохимический анализ экспрессии HBeAg в печени мышей через 27 недель после прекращения лечения.

На фиг. 8A-C показано ингибирование уровней ВИЧ в крови с помощью лечения по стандарту оказания медицинской помощи или лечения обработанными бактериями у гуманизированных мышей, инфицированных ВИЧ.

#### **Подробное описание изобретения**

В нижеследующем описании представлены иллюстративные варианты реализации настоящей технологии. Однако следует понимать, что такое описание не подразумевает ограничительного характера в отношении объема настоящего изобретения, а вместо этого предоставлено в качестве описания иллюстративных вариантов реализации.

В контексте настоящей заявки следующие слова, фразы и символы обычно имеют значения, указанные ниже, за исключением случаев, когда из контекста, в котором они используются, следует иное.

Композиции и способы стимуляции иммунного ответа

Экспериментальные примеры настоящего изобретения демонстрируют, что интактные и нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки, обработанные для значительного снижения активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина, неожиданно обладали повышенной способностью индуцировать секрецию цитокинов иммунными клетками. Таким образом, такие обработанные бактериальные клетки подходят для обеспечения безопасных и эффективных средств для стимуляции иммунного ответа субъекта. Иммунный ответ может быть направлен против бактериальных, грибковых, паразитарных или вирусных инфекций.

Таким образом, в соответствии с одним из вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. В еще одном варианте реализации предложен способ профилактики или лечения инфекции у нуждающегося в этом пациента. В еще одном варианте реализации предложен способ лечения иммунодефицита у нуждающегося в этом пациента. В еще одном варианте реализации предложен способ вакцинации субъекта, подверженного риску инфицирования.

В некоторых вариантах реализации указанный способ предусматривает введение указанному субъекту/пациенту эффективного количества композиции, содержащей множество обработанных бактериальных клеток, как раскрыто в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации обработанные бактериальные клетки представляют собой интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки, которые были обработаны для снижения активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина и/или пирогенности.

Подходящие бактериальные организмы, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению, являются грамотрицательными и получены из организмов, которые обладают активностью ЛПС-ассоциированного эндотоксина, таких как организмы дикого типа. Термин "грамотрицательные бактерии" относится к бактериям, которые не сохраняют исходное окрашивание основным красителем (например, кристаллическим фиолетовым), которое является частью процедуры, известной как окрашивание по Граму. При типичном окрашивании по Граму клетки сначала фиксируют на предметном стекле под воздействием тепла и окрашивают основным красителем (например, кристаллическим фиолетовым), который поглощается как грамотрицательными, так и грамположительными бактериями. Затем предметные стекла обрабатывают протравой (например, йодом для окрашивания по Граму), которая связывается с основным красителем (например, кристаллическим фиолетовым) и задерживает его в клетке. Затем клетки промывают ацетоном или спиртом, а затем дополнительно окрашивают вторым красителем

другого цвета (например, сафранином). Грамположительные организмы сохраняют исходное фиолетовое окрашивание, в то время как грамотрицательные организмы обесцвечиваются при промывке органическим растворителем и, следовательно, демонстрируют дополнительное окрашивание. Примеры грамотрицательных бактерий включают, не ограничиваясь перечисленным, *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Aeromonas* spp., *Francisella* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp., *Bordetella* spp., *Legionella* spp., *Corynebacteria* spp., *dtrobacter* spp., *Chlamydia* spp., *Brucella* spp., *Pseudomonas* spp., *Helicobacter* spp. и *Vibrio* spp.

К числу грамотрицательных организмов относятся *Enterobacteriaceae* - большое семейство, которое наряду со многими безвредными симбионтами включает многие хорошо известные патогены, такие как *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella* и *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* и *Citrobacter*. Члены семейства *Enterobacteriaceae* были названы энтеробактериями, поскольку некоторые его члены живут в кишечнике животных.

В одном из вариантов реализации в качестве организма выбрана *E. coli*. Одним отдельно взятым рассматриваемым штаммом является штамм *E. coli* 2617-143-312, (Migula) Каstellани (Castellani) и Чалмерс (Chalmers) ((ATCC® 13070™). Дополнительные штаммы *is. coli*, которые можно применять, включают MG1655 (ATCC® 47076) и KY8284 (ATCC® 21272).

Грамотрицательные организмы, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, не обязательно должны представлять собой рекомбинантные организмы, которые содержат или экспрессируют ДНК, чужеродную для формы организма дикого типа. Однако в некоторых вариантах реализации организмы могут быть модифицированы для экспрессии некоторых ненативных молекул, включая, например, антигены патогенов или иммуностимулирующие белки.

Термин "липополисахарид" (ЛПС) относится к крупным молекулам, состоящим из липида и полисахарида (гликофосфолипид), соединенных ковалентной связью. ЛПС содержит три части: 1) О-антиген; 2) центральный олигосахарид и 3) липид А. О-антиген представляет собой повторяющийся гликановый полимер, присоединенный к центральному олигосахариду, и содержит самый дальний домен молекулы ЛПС. Центральный олигосахарид присоединяется непосредственно к липиду А и обычно содержит сахара, такие как гептоза и 3-дезоксид-Д-маннооуктулозоновая кислота (также известная как КДО, кетодезоксиоуктулозонат). Липид А представляет собой фосфорилированный глюкозаминный дисахарид, связанный с несколькими жирными кислотами. Указанные жирные кислоты "закоривают" ЛПС в наружной бактериальной мембране, а оставшаяся часть ЛПС выступает из клеточной поверхности.

Активность эндотоксина присуща области домена липида А ЛПС и, таким образом, также называется "активностью ЛПС-ассоциированного эндотоксина". Когда бактериальные клетки подвергаются лизису иммунной системой, фрагменты мембраны, содержащие ЛПС и липид А, высвобождаются в кровообращение, вызывая лихорадку (пирогенность) и потенциально смертельный шок (называемый эндотоксическим или септическим шоком). Токсичность ЛПС опосредуется липидом А через взаимодействие с клетками иммунной системы млекопитающего - процесс, приводящий к секреции провоспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ ) и интерлейкин-1-бета (IL-1 $\beta$ ), которые могут иметь смертельные последствия для хозяина.

Активность ЛПС-ассоциированного эндотоксина может быть измерена способами, хорошо известными в данной области техники, включая, например, анализ с применением лизата амёбоцитов *Limulus* (ЛАЛ), в котором используют кровь мечехвоста и который позволяет детектировать очень низкие уровни ЛПС. Наличие активности эндотоксина будет приводить к свертыванию лизата крови *Limulus* вследствие амплификации через ферментативный каскад. Коммерчески доступны гель-тромб, турбидиметрические и хромогенные формы анализа ЛАЛ.

Также известны анализы активности эндотоксина на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), такие как EndoLISA® от Hyglos, Мюнхен, Германия. В этом анализе используют ЛПС-специфичный фаговый белок, присоединенный к твердой фазе для захвата ЛПС, и после этапа промывки определяют присутствие ЛПС путем добавления рекомбинантного фактора С, который при активации посредством ЛПС расщепляет соединение, которое затем испускает флуоресценцию. Фактор С, присутствующий в лизате амёбоцитов *Limulus*, обычно существует в виде зимогена и представляет собой праймер каскада свертывания, происходящего в тесте ЛАЛ.

Пирогенность относится к способности агента вызывать лихорадку у субъекта. Пирогенность может быть измерена по повышению ректальной температуры у кроликов в ответ на внутривенное введение агонистов TLR, организмов или их производных.

Доступны различные способы снижения активности эндотоксина и/или пирогенности грамотрицательных организмов. Указанные способы включают обработку организмов агентом, который связывается с ЛПС или нарушает его образование.

В одном из вариантов реализации снижение активности эндотоксина или пирогенности достигается путем обработки бактериальных организмов антибиотиком, инактивирующим эндотоксин. Подходящим подобным антибиотиком является полимиксин, включая полимиксин В или полимиксин Е. Специалист в данной области техники способен определить количество антибиотика и условия обработки. В одном из

вариантов реализации полимиксин, представляющий собой полимиксин В или полимиксин Е, можно применять в концентрации, составляющей приблизительно от 3 микрограмм до 5000 микрограмм на миллилитр. В еще одном варианте реализации концентрация полимиксина может составлять от приблизительно 200 микрограмм до 5000 микрограмм на миллилитр. В одном из вариантов реализации антибиотик применяют к бактериям на протяжении от 10 минут до 4 часов или от приблизительно 30 минут до приблизительно 3 часов.

В одном из вариантов реализации бактерии выращивают в присутствии магния (Mg) в форме  $MgCl_2$ . В одном из вариантов реализации бактерии обрабатывают полимиксином в присутствии  $MgCl_2$ , а также при температуре, подходящей для сохранения целостности бактерий. В одном из вариантов реализации концентрация  $MgCl_2$  в питательной среде составляет от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 5,0 мМ или приблизительно 2 мМ, и концентрация  $MgCl_2$  в среде для обработки составляет от приблизительно 5,0 мМ до приблизительно 30 мМ или приблизительно 20 мМ. В одном из вариантов реализации температура среды для обработки составляет от приблизительно 2°C до приблизительно 10°C или приблизительно 4°C. Целостность бактерий определяют по эффективности извлечения в хорошо выраженном осадке после центрифугирования при  $3000\times g$  в течение 10 минут и путем электронной или оптической микроскопии с окрашиванием по Граму. В предпочтительном варианте реализации извлечение бактерий после обработки и промывки составляет более приблизительно 80%, и бактерии выглядят интактными по данным оптической или электронной микроскопии.

В еще одном варианте реализации снижение активности эндотоксина достигается путем обработки бактериальных организмов антибиотиком, который, как известно, нарушает биосинтез комплекса KDO-липид IV<sub>A</sub>. Например, Goldman et al., J

Bacteriol. 170(5):2185-91, 1988 описывают антибактериальные агенты, включая антибактериальный агент III, которые специфично ингибируют активность СТР:СМР-3-дезоксид-маннооктулозонатцитидилтрансферазы и которые подходят для блокирования включения 3-дезоксид-маннооктулозоната (KDO) в ЛПС грамотрицательных организмов. С прекращением синтеза ЛПС прекращался рост бактерий. Присоединение KDO к предшественникам ЛПС, липидам IV<sub>A</sub>, представляет собой основной путь образования комплекса липид А-KDO как в *S. typhimurium*, так и в *E. coli*. В одном из вариантов реализации антибиотик представляет собой антибактериальный агент III, и грамотрицательные бактерии обрабатывают подходящим количеством, таким как, например, от 5 микрограмм на миллилитр до 500 микрограмм на миллилитр, в течение подходящего времени, например, от 2 до 8 часов.

Аналогичным образом известно, что соединение альфа-С-(1,5-ангидро-7-амино-2,7-дидезокси-Д-манногептопиранозилкарбоксилат ингибирует 3-дезоксид-манно-октулозонатцитидилтрансферазу (СМР-KDO синтетазу), цитоплазматический фермент, который активирует 3-дезоксид-маннооктулозонат (KDO) для включения в ЛПС (Nature. 1987 10-16;329(6135):162-4). Следовательно, обработка организмов этим соединением может также снизить активность ЛПС-ассоциированного эндотоксина.

В еще одном варианте реализации снижение активности эндотоксина достигается путем обработки организмов ингибитором ЛПС. Например, было показано, что бактериальный циклический липопептид сурфактин связывается с липидом А, подавляя его активность (J Antibiot 2006 59(1):35-43).

В дополнение к ЛПС-ассоциированному эндотоксину различные другие компоненты грамотрицательных организмов могут индуцировать или вносить вклад в пирогенность и септический шок, в том числе белки наружной мембраны, фимбрии, пили, липопептиды и липопротеины (рассмотрены Jones, M., Int. J. Pharm. Compd., 5(4):259-263, 2001). Пирогенность может быть измерена способом с кроликами, хорошо известным в данной области техники, включающим оценку ректальной температуры после внутривенного введения предполагаемых пирогенов.

Было обнаружено, что обработка грамотрицательного организма комбинацией полимиксина В и глутаральдегида приводила к 30-кратному снижению пирогенности согласно измерениям у кроликов. В одном из вариантов реализации использовали 1000 микрограмм на миллилитр (мкг/мл) полимиксина В и 1% глутаральдегида для достижения 30-кратного снижения пирогенности согласно измерениям у кроликов. Пирогенность снижается под действием комбинации реакции полимиксина В с ЛПС и реактивности глутаральдегида с ЛПС и/или другими компонентами бактерий. В этих обстоятельствах глутаральдегид играет двойную роль, также нейтрализуя бактерии.

Таким образом, в одном из вариантов реализации предложен способ снижения активности эндотоксина и пирогенности грамотрицательного бактериального микроорганизма, и его нейтрализации путем обработки указанных бактерий комбинацией 1000 мкг/мл полимиксина В и 1% глутаральдегида. В еще одном варианте реализации грамотрицательные бактерии обрабатывают комбинацией полимиксина В в диапазоне доз от приблизительно 3 мкг/мл до приблизительно 1000 мкг/мл и глутаральдегида в диапазоне доз от приблизительно 0,1% до приблизительно 1,0%. В дополнительном варианте реализации диапазон доз полимиксина В составляет от приблизительно 100 мкг/мл до приблизительно 1000 мкг/мл, и глутаральдегид применяют в диапазоне доз от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,0%. Кроме того, грамотрицательные бактерии могут быть обработаны, например, диапазоном доз полимиксина В от при-

близительно 1000 мкг/мл до приблизительно 3000 мкг/мл, и глутаральдегид применяют в диапазоне доз от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,0%. В соответствии с еще одним аспектом грамотрицательные бактерии могут быть обработаны, например, диапазоном доз полимиксина В от приблизительно 3000 мкг/мл до приблизительно 5000 мкг/мл, и глутаральдегид применяют в диапазоне доз от приблизительно 0,5% до приблизительно 2,0%.

В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки характеризуются по меньшей мере приблизительно 70% снижением активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина (например, при измерении с помощью анализа ЛАЛ) по сравнению с необработанными бактериями дикого типа. В некоторых вариантах реализации снижение составляет по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95% или 99,98%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет не более чем приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет от приблизительно 70% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 90% до приблизительно 99,5% или 99%, от приблизительно 91% до приблизительно 99%, от приблизительно 92% до приблизительно 98%, от приблизительно 93% до приблизительно 97%, от приблизительно 94% до приблизительно 96%, от приблизительно 94,5% до приблизительно 95,5%, от приблизительно 94% до приблизительно 97%, от приблизительно 95% до приблизительно 98%, от приблизительно 96% до приблизительно 99%, от приблизительно 97% до приблизительно 99,5% или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, не ограничиваясь перечисленным.

В некоторых вариантах реализации предпочтительны определенные остаточные уровни активного ЛПС. Например, в некоторых вариантах реализации в композиции согласно настоящему изобретению содержится приблизительно от 1 до 200 нг активного ЛПС на  $1 \times 10^8$  клеток. В некоторых вариантах реализации содержится приблизительно от 2 до 200 нг, приблизительно от 5 до 150 нг, приблизительно от 5 до 120 нг, приблизительно от 10 до 120 нг, приблизительно от 20 до 100 нг, приблизительно от 20 до 50 нг, приблизительно от 10 до 50 нг активного ЛПС на  $1 \times 10^8$  клеток.

В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки характеризуются по меньшей мере приблизительно 70% снижением пирогенности (например, при измерении с помощью анализа на кроликах *in vivo*) по сравнению с необработанными бактериями дикого типа. В некоторых вариантах реализации снижение составляет по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95% или 99,98%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет не более чем приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет от приблизительно 70% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 90% до приблизительно 99,5% или 99%, от приблизительно 91% до приблизительно 99%, от приблизительно 92% до приблизительно 98%, от приблизительно 93% до приблизительно 97%, от приблизительно 94% до приблизительно 96%, от приблизительно 94,5% до приблизительно 95,5%, от приблизительно 94% до приблизительно 97%, от приблизительно 95% до приблизительно 98%, от приблизительно 96% до приблизительно 99%, от приблизительно 97% до приблизительно 99,5% или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, не ограничиваясь перечисленным.

Как указано выше, в дополнение к ЛПС-ассоциированному эндотоксину различные другие компоненты грамотрицательных организмов также могут индуцировать или вносить вклад в пирогенность, такие как белки наружной мембраны, фимбрии, пили, липопептиды и липопротеины. В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки обрабатывают таким образом, чтобы снижение пирогенности достигалось как за счет снижения активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина, так и за счет снижения пирогенности, не связанной с ЛПС, например, путем инактивации, удаления или блокирования белков наружной мембраны, фимбрий, пилей, липопептидов или липопротеинов. В некоторых вариантах реализации снижение не связанной с ЛПС пирогенности составляет по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95% или 99,98%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет не более чем приблизительно 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99%.

Бактерии для введения в соответствии со способами согласно настоящему изобретению приводят в нежизнеспособное или по существу нежизнеспособное состояние либо перед введением, либо они становятся таковыми после введения. Термин "нежизнеспособный" означает, что организмы нейтрализуют путем обработки экзогенным агентом, и/или они содержат мутацию, которая приводит к неспособности организмов выживать в организме хозяина-млекопитающего. По существу, нежизнеспособные бактерии представляют собой штаммы, жизнеспособность которых была снижена по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более.

Бактерии могут быть приведены в нежизнеспособное состояние путем обработки таким соединени-

ем, как полимиксин. Полимиксин связывается с ЛПС и нарушает целостность мембраны по мере деления бактерий, при этом жизнеспособность снижается в результате проницаемости клеточной оболочки. При снижении жизнеспособности с помощью этого метода необходимо предпринимать меры для предотвращения лизиса клеток и сохранения интактного состояния клеток.

Еще один подход заключается в выращивании бактериальных штаммов с условными мутациями в пути биосинтеза ЛПС, которые подавляются во время роста, а затем переходят в непермиссивные условия, которые активируют мутацию и нарушают биосинтез ЛПС. В каждом случае используемая процедура представляет собой процедуру, приводящую бактерии в нежизнеспособное состояние путем определения в каждой ситуации оптимального времени обработки или дозы соединения, чтобы жизнеспособность по существу утрачивалась с сохранением значительной целостности бактериальной клетки. В случае, когда нежизнеспособность составляет менее 100%, могут быть использованы бактерии, содержащие мутацию, предотвращающую дальнейшую пролиферацию жизнеспособных бактерий у хозяина-млекопитающего (например, ауксотроф с диаминопимелиновой кислотой, описанный Bukhari and Taylor, *J. Bacteriol.* 105(3):844-854, 1971 и Curtiss et al., *Immunol. Invest.* 18(1-4):583-596, 1989).

#### Заболевания и состояния

Интактные и по существу нежизнеспособные грамтрицательные бактериальные клетки, как раскрыто в настоящей заявке, подходят для усиления иммунной системы субъекта и, таким образом, подходят для профилактики или лечения заболеваний и состояний посредством улучшенного иммунного ответа. Интактные и по существу нежизнеспособные грамтрицательные бактериальные клетки, раскрытые в настоящей заявке, также могут применяться в качестве вакцин или иммунологических адъювантов для субъектов с риском развития таких заболеваний или состояний.

"Лечение" или "осуществление лечения" представляет собой подход к получению благоприятных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Благоприятные или желаемые клинические результаты могут включать одно или более из следующего: а) ингибирование заболевания или состояния (например, уменьшение одного или более симптомов, возникающих в результате заболевания или состояния, и/или уменьшение степени заболевания или состояния); б) замедление или остановка развития одного или более клинических симптомов, связанных с заболеванием или состоянием (например, стабилизация заболевания или состояния, профилактика или отсрочка ухудшения или прогрессирования заболевания или состояния, и/или профилактика или отсрочка распространения (например, метастазирования) заболевания или состояния); и/или с) облегчение заболевания, то есть регресс клинических симптомов (например, улучшение течения заболевания, обеспечение частичной или полной ремиссии заболевания или состояния, усиление эффекта другого лекарственного средства, замедление прогрессирования заболевания, повышение качества жизни и/или продление выживаемости).

"Профилактика" или "осуществление профилактики" означает любое лечение заболевания или состояния, при котором не развиваются клинические симптомы заболевания или состояния. В некоторых вариантах реализации бактериальные клетки могут быть введены субъекту (включая человека), который подвержен риску развития или имеет в семейном анамнезе случаи заболевания или состояния.

"Субъект" относится к животному, такому как млекопитающее (включая человека), которое было или будет объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Описанные в настоящей заявке способы могут быть применимы в терапии человека и/или в ветеринарии. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, собака, кошка, корова, овца и т. п. В одном из вариантов реализации субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах реализации заболевания или состояния, подлежащие лечению, представляют собой инфекционные заболевания. В некоторых вариантах реализации инфекция вызвана бактериями, грибами, паразитами или вирусами. В частности, раскрытые в настоящей заявке бактериальные клетки могут быть уникально подходящими для лечения вирусных инфекций, таких как инфекции, вызванные вирусами, перечисленными в табл. А, необязательно с помощью дополнительного противои инфекционного агента.



## Перечень вирусов

<b>Вирус</b>	<b>Род, семейство</b>
Аденоассоциированный вирус	Dependovirus, Parvoviridae
Вирус Аичи	Kobuvirus, Picornaviridae
Лиссавирус австралийских летучих мышей	Lyssavirus, Rhabdoviridae
Полиомавирус ВК	Polyomavirus, Polyomaviridae
Вирус Банна	Seadornavirus, Reoviridae
Вирус леса Барма	Alphavirus, Togaviridae
Вирус Буньямвера	Orthobunyavirus, Bunyaviridae
Буньявирус Ла-Кросс	Orthobunyavirus, Bunyaviridae

Буньявирус зайца-беляка	Orthobunyavirus, Bunyaviridae
Герпесвирус мартышковых	Lymphocryptovirus, Herpesviridae
Вирус Чандипура	Vesiculovirus, Rhabdoviridae
Вирус Чикунгунья	Alphavirus, Togaviridae
Косавирус А	Cosavirus, Picornaviridae
Вирус коровьей оспы	Orthopoxvirus, Poxviridae
Вирус Коксаки	Enterovirus, Picornaviridae
Вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки	Nairovirus, Bunyaviridae
Вирус Денге	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус Дхори	Thogotovirus, Orthomyxoviridae
Вирус Дугбе	Nairovirus, Bunyaviridae
Вирус Дувенхаге	Lyssavirus, Rhabdoviridae
Вирус восточного энцефалита лошадей	Alphavirus, Togaviridae
Вирус Эбола	Ebolavirus, Filoviridae
Эховирус	Enterovirus, Picornaviridae
Вирус энцефаломиокардита	Cardiovirus, Picornaviridae
Вирус Эпштейна-Барр	Lymphocryptovirus, Herpesviridae
Лиссавирус европейских летучих мышей	Lyssavirus, Rhabdovirus
GB вирус С/вирус гепатита G	Pegivirus, Flaviviridae
Вирус Хантаан	Hantavirus, Bunyaviridae
Вирус Хендра	Henipavirus, paramyxoviridae
Вирус гепатита А	Hepatovirus, picornaviridae
Вирус гепатита В	Orthohepadnavirus, Hepadnaviridae
Вирус гепатита С	Hepacivirus, Flaviviridae
Вирус гепатита Е	Hepivirus, не присвоен
Вирус гепатита дельта	Deltavirus, не присвоен
Вирус оспы лошадей	Orthopoxvirus, Poxviridae
Аденовирус человека	Mastadenovirus, Adenoviridae
Астровирус человека	Mamastrovirus, Astroviridae
Коронавирус человека	Alphacoronavirus, Coronaviridae
Цитомегаловирус человека	Cytomegalovirus, Herpesviridae
Энтеровирус человека 68, 70	Enterovirus, Picornaviridae
Герпесвирус человека 1	Simplexvirus, Herpesviridae
Герпесвирус человека 2	Simplexvirus, Herpesviridae
Герпесвирус человека 6	Roseolovirus, Herpesviridae
Герпесвирус человека 7	Roseolovirus, Herpesviridae
Герпесвирус человека 8	Rhadinovirus, Herpesviridae
Вирус иммунодефицита человека	Lentivirus, Retroviridae
Вирус папилломы человека 1	Mupapillomavirus, Papillomaviridae
Вирус папилломы человека 2	Alphapapillomavirus, Papillomaviridae

Вирус папилломы человека 16,18	Alphapapillomavirus, Papillomaviridae
Парагрипп человека	Respirovirus, Paramyxoviridae
Парвовирус человека В19	Erythrovirus, Parvoviridae
Респираторно-синцитиальный вирус человека	Orthopneumovirus, Pneumoviridae
Риновирус человека	Enterovirus, Picomaviridae
Коронавирус SARS человека	Betacoronavirus, Coronaviridae
Спумаретровирус человека	Spumavirus, Retroviridae
Т-лимфотропный вирус человека	Deltaretrovirus, Retroviridae
Торовирус человека	Torovirus, Coronaviridae
Вирус гриппа А	Influenzavirus A, Orthomyxoviridae
Вирус гриппа В	Influenzavirus B, Orthomyxoviridae
Вирус гриппа С	Influenzavirus C, Orthomyxoviridae
Вирус Исфахан	Vesiculovirus, Rhabdoviridae
Полиомавирус JC	Polyomavirus, Polyomaviridae
Вирус японского энцефалита	Flavivirus, Flaviviridae
Аренавирус Хунин	Arenavirus, Arenaviridae
Полиомавирус KI	Polyomavirus, Polyomaviridae
Вирус Кунджин	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус летучих мышей Лагоса	Lyssavirus, Rhabdoviridae
Марбургвирус озера Виктория	Marburgvirus, Filoviridae
Вирус Лангат	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус Ласса	Arenavirus, Arenaviridae
Вирус Лордсдейла	Norovirus, Caliciviridae
Вирус шотландского энцефаломиелита овец	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус лимфоцитарного хориоменингита	Arenavirus, Arenaviridae
Вирус Мачупо	Arenavirus, Arenaviridae
Вирус Маяро	Alphavirus, Togaviridae
Коронавирус MERS	Betacoronavirus, Coronaviridae
Вирус кори	Morbilivirus, Paramyxoviridae
Вирус энцефаломиокардита Менго	Cardiovirus, Picornaviridae
Полиомавирус клеток Меркеля	Polyomavirus, Polyomaviridae
Вирус Мокола	Lyssavirus, Rhabdoviridae
Вирус контагиозного моллюска	Molluscipoxvirus, Poxviridae
Вирус оспы обезьян	Orthopoxvirus, Poxviridae
Вирус эпидемического паротита	Rubulavirus, Paramyxoviridae
Вирус энцефалита долины Мюррей	Flavivirus, Flaviviridae
Нью-йоркский вирус	Hantavirus, Bunyavirus
Вирус Нипах	Henipavirus, Paramyxoviridae
Вирус Норуолк	Norovirus, Caliciviridae
Вирус О'ньонг-ньонг	Alphavirus, Togaviridae

Вирус Орф	Parapoxvirus, Poxviridae
Вирус Оропуш	Orthobunyavirus, Bunyaviridae
Вирус Пичинде	Arenavirus, Arenaviridae
Полиовирус	Enterovirus, Picornaviridae
Флебовирус Пунта-Торо	Phlebovirus, Bunyaviridae
Вирус Пуумала	Hantavirus, Bunyavirus
Вирус бешенства	Lyssavirus, Rhabdoviridae
Вирус лихорадки долины Рифт	Phlebovirus, Bunyaviridae
Росавирус А	Rosavirus, Picornaviridae
Вирус реки Росс	Alphavirus, Togaviridae
Ротавирус А	Rotavirus, Reoviridae
Ротавирус В	Rotavirus, Reoviridae
Ротавирус С	Rotavirus, Reoviridae
Вирус краснухи	Rubivirus, Togaviridae
Вирус Сагияма	Alphavirus, Togaviridae
Саливирус А	Salivirus, Picornaviridae
Вирус сицилийской москитной лихорадки	Phlebovirus, Bunyaviridae
Вирус Саппоро	Sapovirus, Caliciviridae
Вирус леса Семлики	Alphavirus, Togaviridae
Вирус Сеул	Hantavirus, Bunyavirus
Обезьяний пеннистый вирус	Spumavirus, Retroviridae
Вирус обезьян 5	Rubulavirus, Paramyxoviridae
Вирус Синдбис	Alphavirus, Togaviridae
Вирус Саутгемптона	Norovirus, Caliciviridae
Вирус энцефалита Сент-Луис	Flavivirus, Flaviviridae
Клещевой вирус Повассан	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус гепатита ТТВ	Alphatorquevirus, Anelloviridae
Вирус Тосканы	Phlebovirus, Bunyaviridae
Вирус Укуниемеи	Phlebovirus, Bunyaviridae
Вирус осповакцины	Orthopoxvirus, Poxviridae
Вирус ветряной оспы	Varicellovirus, Herpesviridae
Вирус натуральной оспы	Orthopoxvirus, Poxviridae
Вирус венесуэльского энцефалита лошадей	Alphavirus, Togaviridae
Вирус везикулярного стоматита	Vesiculovirus, Rhabdoviridae
Вирус западного энцефалита лошадей	Alphavirus, Togaviridae
Полиомавирус WU	Polyomavirus, Polyomaviridae
Вирус Западного Нила	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус опухоли обезьяны Яба	Orthopoxvirus, Poxviridae
Вирус Яба-подобной болезни	Orthopoxvirus, Poxviridae
Вирус желтой лихорадки	Flavivirus, Flaviviridae
Вирус Зика	Flavivirus, Flaviviridae

В некоторых вариантах реализации заболевание, лечение которого осуществляют, представляет собой инфекцию НВV. В некоторых вариантах реализации заболевание, лечение которого осуществляют, представляет собой инфекцию ВИЧ.

#### Введение доз и периодичность

В некоторых вариантах реализации может быть определен уровень активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, вводимых субъекту. В одном из вариантов реализации вводимая композиция содержит

приблизительно от 0,01 до 200 нг активного ЛПС на кг массы тела субъекта.

Термин "активный ЛПС" относится к ЛПС в композиции, которая способна проявлять активность ЛПС-ассоциированного эндотоксина, например, при измерении с помощью анализа ЛАЛ, где 5-9 единиц эндотоксина (ЕЭ) считаются эквивалентными 1 нг активного ЛПС на основе стандартного препарата ЛПС. Количество активного ЛПС в композиции может быть описано как масса неингибированного ЛПС, способная проявлять такой же уровень активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина, что и композиция.

В некоторых вариантах реализации вводимая композиция (например, композиция, обладающая активностью ЛПС-ассоциированного эндотоксина интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток) содержит приблизительно от 0,01 до 150 нг активного ЛПС на кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации вводимая композиция содержит приблизительно от 0,02 до 150 нг, приблизительно от 0,02 до 100 нг, приблизительно от 0,05 до 100 нг, приблизительно от 0,05 до 100 нг, приблизительно от 0,05 до 50 нг, приблизительно от 0,05 до 20 нг, приблизительно от 0,1 до 20 нг, приблизительно от 0,1 до 10 нг, приблизительно от 0,1 до 5 нг, приблизительно от 0,2 до 100 нг, приблизительно от 0,2 до 50 нг, приблизительно от 0,2 до 20 нг, приблизительно от 0,2 до 10 нг, приблизительно от 0,2 до 5 нг, приблизительно от 0,3 до 90 нг, приблизительно от 0,4 до 80 нг, приблизительно от 0,5 до 70 нг, приблизительно от 0,6 до 60 нг, приблизительно от 0,7 до 50 нг, приблизительно от 0,8 до 40 нг, приблизительно от 0,9 до 30 нг, приблизительно от 1 до 20 нг, приблизительно от 2 до 15 нг или приблизительно от 3 до 12 нг активного ЛПС на кг массы тела субъекта.

Количество активного ЛПС, вводимого субъекту, может варьироваться в зависимости от типа субъекта и заболевания. Для некоторых животных, таких как мыши, крысы и собаки, может быть эффективно использовано более высокое количество (например, в 250-500 раз более высокое по сравнению с людьми и кроликами) активного ЛПС. Соответственно, в некоторых вариантах реализации вводимая композиция содержит приблизительно от 10 до 100000 нг активного ЛПС на кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах реализации вводимая композиция содержит приблизительно от 20 до 50000 нг, приблизительно от 30 до 40000 нг, приблизительно от 40 до 30000 нг, приблизительно от 50 до 20000 нг, приблизительно от 0,7 до 10000 нг, приблизительно от 80 до 8000 нг, приблизительно от 90 до 7000 нг, приблизительно от 100 до 6000 нг, приблизительно от 200 до 5000 нг или приблизительно от 500 до 5000 нг активного ЛПС на кг массы тела субъекта.

Количество бактериальных клеток, вводимое субъекту, может быть определено на основании необходимого количества активного ЛПС и уровня активности эндотоксина бактериальных клеток. Количество также может зависеть от различных факторов, включая возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, питание, время введения, способ введения и скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания у субъекта, проходящего терапию. Например, дозировка может быть выражена как количество бактериальных клеток, описанных в настоящей заявке, на килограмм массы тела субъекта (мг/кг). Могут быть подходящими дозировки приблизительно от 10000 до 100000000 клеток/кг. В некоторых вариантах реализации может быть подходящим приблизительно от 100000 до 1000000 клеток/кг. В других вариантах реализации может быть подходящей дозировка от 1000000 до 5000000 клеток/кг. Нормирование также может быть произведено на основе площади поверхности тела, выраженной в квадратных метрах ( $m^2$ ). В некоторых вариантах реализации могут быть подходящими дозировки приблизительно от 10000 до 100000000 клеток/ $m^2$ . В некоторых вариантах реализации может быть подходящим приблизительно от 100000 до 100000000 клеток/ $m^2$ . В других вариантах реализации может быть подходящей дозировка от 1000000 до 5000000 клеток/ $m^2$ . Нормирование в соответствии с массой тела субъекта является особенно подходящим при корректировке дозровок между субъектами значительно различающегося размера, например, при применении лекарственного средства как у детей, так и у взрослых людей, или при преобразовании эффективной дозировки у субъектов, отличных от человека, таких как собака, в дозировку, подходящую для человека.

Бактериальные клетки обычно вводят после диагностики заболевания или состояния. В некоторых вариантах реализации введение начинают в течение 24 часов после инфицирования или в течение 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней после инфицирования. В некоторых вариантах реализации введение начинают через по меньшей мере 24 часа после инфицирования или через по меньшей мере 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после инфицирования. В некоторых вариантах реализации введение начинают в любое время до или после инфицирования, и оно может проводиться по мере необходимости.

Введение также может начинаться до фактического инфицирования или до того, как инфекция будет диагностирована, в качестве профилактической вакцины или профилактики.

#### Комбинированные виды терапии

В одном из вариантов реализации бактериальные клетки, раскрытые в настоящей заявке, могут быть использованы в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, которые используются и/или разрабатываются для лечения инфекций.

В некоторых вариантах реализации один или более дополнительных терапевтических агентов могут представлять собой ингибиторы ферментов циклооксигеназы (СОХ), такие как НПВП, включая 6MNA (6-метокси-2 нафтилуксусная кислота), аспирин, карпрофен, диклофенак, фенпрофен, флуфенамат, флу-

бипрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, меклофенамат, мефенаминовая кислота, напроксен, нифлумовая кислота, пироксикам, сульфид сулиндака, супрофен, тенитап, толметин, томоксипрол, зомепирак, цефекоксиб, этодолак, мелоксикам, нимесулид, диизопропилфторфосфат, L745,337, NS398, рофекоксиб, SC58125, S-аминосалициловая кислота, ампирон, дифлунизал, набуметон, парацетамол, ресвератрол, салицин, салициловый альдегид, салицилат натрия, сульфасалазин, сулиндак, тамоксифен, тиклопидин и валерил-салицилат.

В некоторых вариантах реализации один или более дополнительных терапевтических агентов могут быть агонистами стимулирующих иммунных контрольных точек, таких как CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR и ICOS, или антагонистами ингибирующих иммунных контрольных точек, таких как A2AR, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, PD-L1, TIM-3 и VISTA.

Неограничивающие примеры одного или более дополнительных терапевтических агентов также включают абакавир, ацикловир, адефовир, амантадин, ампренавир, амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, балавир, цидофовир, комбивир, долутегравир, дарунавир, делавирдин, диданозин, докозанол, эдоксудин, эфавиренз, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, эколивер, фамцикловир, фомивирсен, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, ганцикловир, ибацитабин, имуновир, идоксуридин, имиквимод, индинавир, инозин, ингибитор интегразы, интерферон III типа, интерферон II типа, интерферон I типа, интерферон, ламивудин, лопинавир, ловирид, маравирик, мороксидин, метгисазон, нелфинавир, неврирапин, нексавир, нитазоксанид, аналоги нуклеозидов, норвир, осельтамивир (Tamiflu®), пегинтерферон альфа-2a, пенцикловир, перамивир, плеконарил, подофиллотоксин, ингибитор протеазы, ралтегравир, рибавирин, римантадин, ритонавир, пирамидин, саквинавир, софосбувир, ставудин, теллапревир, тенофовир, тенофовир дизопроксил, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валацикловир, валганцикловир, викривирик, видарабин, вирамидин, зальцитабин, занамивир и зидовудин.

В одном из вариантов реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой интерферон альфа.

В некоторых вариантах реализации грамотрицательные организмы включают полинуклеотид, кодирующий небактериальный белок, такой как, например, вирусоспецифичные антигены или белки, стимулирующие иммунную систему. В некоторых вариантах реализации грамотрицательные организмы включают полинуклеотид, кодирующий бактериальный антиген, который может происходить из того же или другого бактериального организма, включая грамположительные организмы или другой патоген. В контексте настоящей заявки антиген представляет собой любую молекулу, которая может распознаваться иммунным ответом - антителом либо иммунной клеткой.

Фармацевтические композиции, дозированные формы и способы введения

В настоящей заявке описаны различные композиции, подходящие для лечения заболеваний или состояний. В одном из вариантов реализации предложена композиция или дозированная форма, содержащая множество интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, которые были обработаны таким образом, чтобы это привело к снижению активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина на приблизительно 90-99% при измерении с помощью анализа с лизатом амёбоцитов *Limulus* (ЛАЛ) по сравнению с необработанными грамотрицательными бактериальными клетками дикого типа, где общая активность ЛПС-ассоциированного эндотоксина эквивалентна приблизительно от 0,7 нг до 7000 нг активного ЛПС, приблизительно от 7 нг до 7000 нг активного ЛПС, приблизительно от 7 нг до 1400 нг активного ЛПС или приблизительно от 70 нг до 1400 нг активного ЛПС.

Композиции могут применяться в качестве адъювантов или модификаторов биологического ответа. В контексте настоящей заявки термины "адъювант" и "модификатор биологического ответа" относятся к любому веществу, которое усиливает иммунный ответ на антиген. Таким образом, адъювант или модификатор биологического ответа применяют для стимуляции более активного ответа иммунной системы на чужеродный антиген или болезнетворный или связанный с заболеванием организм. Однако в некоторых вариантах реализации для применения в раскрытых способах предусмотрены рекомбинантные формы грамотрицательных бактерий, которые экспрессируют, например, вирусные белки или белки активации иммунной системы человека, такие как цитокины или хемокины. В альтернативном варианте реализации очищенные белки активации иммунной системы, такие как цитокины или хемокины, смешивают с грамотрицательными организмами до введения или вводят до или после грамотрицательных организмов.

В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки в дозированной форме характеризуются по меньшей мере приблизительно 70% снижением активности ЛПС-ассоциированного эндотоксина (например, при измерении с помощью анализа ЛАЛ) по сравнению с необработанными бактериями дикого типа. В некоторых вариантах реализации снижение составляет по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95% или 99,98%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет не более чем приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет от приблизительно 70% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 90% до приблизительно 99,5% или 99%, от приблизительно 91% до приблизительно 99%, от приблизительно 92% до приблизительно 98%, от приблизительно 93% до приблизительно 97%, от приблизительно 94% до при-

близительно 96%, от приблизительно 94,5% до приблизительно 95,5%, от приблизительно 94% до приблизительно 97%, от приблизительно 95% до приблизительно 98%, от приблизительно 96% до приблизительно 99%, от приблизительно 97% до приблизительно 99,5% или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, не ограничиваясь перечисленным.

В некоторых вариантах реализации интактные и по существу нежизнеспособные граммотрицательные бактериальные клетки в дозированной форме характеризуются по меньшей мере приблизительно 70% снижением пирогенности (например, при измерении с помощью анализа на кроликах *in vivo*) по сравнению с необработанными бактериями дикого типа. В некоторых вариантах реализации снижение составляет по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95% или 99,98%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет не более чем приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет от приблизительно 70% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 80% до приблизительно 99,99%, от приблизительно 90% до приблизительно 99,5% или 99%, от приблизительно 91% до приблизительно 99%, от приблизительно 92% до приблизительно 98%, от приблизительно 93% до приблизительно 97%, от приблизительно 94% до приблизительно 96%, от приблизительно 94,5% до приблизительно 95,5%, от приблизительно 94% до приблизительно 97%, от приблизительно 95% до приблизительно 98%, от приблизительно 96% до приблизительно 99%, от приблизительно 97% до приблизительно 99,5% или от приблизительно 98% до приблизительно 99,9%, не ограничиваясь перечисленным.

В некоторых вариантах реализации снижение не связанной с ЛПС пирогенности составляет по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95% или 99,98%. В некоторых вариантах реализации снижение составляет не более чем приблизительно 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, 99,95%, 99,98% или 99,99%.

В некоторых вариантах реализации жизнеспособность по существу нежизнеспособных бактерий снижена по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более.

В некоторых вариантах реализации дозированная форма включает от приблизительно 10000 до приблизительно  $1 \times 10^{10}$  таких бактериальных клеток. В некоторых вариантах реализации дозированная форма включает от приблизительно 100000 до приблизительно  $1 \times 10^8$  таких бактериальных клеток. В некоторых вариантах реализации дозированная форма включает от приблизительно 1000000 до приблизительно  $1 \times 10^7$  таких бактериальных клеток. В некоторых вариантах реализации дозированная форма включает от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $1 \times 10^8$  таких бактериальных клеток.

В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно включает второй терапевтический/противовирусный агент. В некоторых вариантах реализации второй терапевтический агент представляет собой НПВП (нестероидный противовоспалительный препарат). В некоторых вариантах реализации второй терапевтический агент представляет собой ингибитор циклооксигеназы, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из 6MNA, аспирина, карпрофена, диклофенака, фенопрофена, флуфенамата, флублипрофена, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, кеторолака, меклофенамата, мефенаминовой кислоты, напроксена, нифлумовой кислоты, пироксикама, сульфида сулиндака, супрофена, тенидапа, толметина, томоксипрола, зомепаирака, цецекоксиба, этодолака, мелоксикама, нимесулида, диизопротилфторфосфата, L745, 337, NS398, рофекоксиба, SC58125, S-аминосалициловой кислоты, ампилона, дифлунизала, набуметона, парацетамола, ресвератрола, салицина, салицилового альдегида, салицилата натрия, сульфасалазина, сулиндака, тамоксифена, тиклопидина, валерил-салицилата и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации второй терапевтический агент представляет собой агонист стимулирующей иммунной контрольной точки, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR и ICOS. В некоторых вариантах реализации второй терапевтический агент представляет собой антагонист ингибирующей иммунной контрольной точки, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из A2AR, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, PD-L1, TIM-3 и VISTA.

В некоторых вариантах реализации второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из абакавира, ацикловира, адефовира, амантадина, ампренавира, амплигена, арбидола, атазанавира, атрипла, балавира, цидофовира, комбивира, долутегавира, дарунавира, делавирдина, диданозина, докозанола, эдоксудина, эфавиренза, эмтрицитабина, энфувиртида, энтекавира, эколивера, фамцикловира, фомивирсена, фосампренавира, фоскарнета, фосфонета, ганцикловира, ибацитабина, имуновира, идоксуридина, имиквимода, индинавира, инозина, ингибитора интегразы, интерферона III типа, интерферона II типа, интерферона I типа, интерферона, ламивудина, лопинавира, ловирида, маравирока, мороксидина, метисазона, нелфинавира, невирапина, нексавира, нитазоксанида, аналогов нуклеозидов, норвира, осельтамивира (Tamiflu®), пегинтерферона альфа-2а, пенцикловира, перамивира, плеконарила, подофиллотоксина, ингибитора протеазы, ралтегавира, рибавирина, римантадина, ритонавира, пирамидина, саквинавира, софосбувира, ставудина, теллапревира, тенофовира, тенофовира дизопроксила, типранавира, трифлуридина, тривизвира, тромантадина, трувада, валацикловира, валганцикловира, викривирока, видарабина, вира-

мидина, зальцитабина, занамивира, зидовудина и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации второй терапевтической агент представляет собой интерферон альфа.

Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть приготовлены различными способами для применения в способах, описанных в настоящей заявке. В одном из вариантов реализации композиция содержит организмы, описанные на протяжении всего текста настоящей заявки, и фармацевтически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтически приемлемые носители" относится к любым разбавителям, вспомогательным веществам или носителям, которые могут быть использованы в композициях. Фармацевтически приемлемые носители включают ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат магния, протаминсульфат, гидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-сополимеры, полиэтиленгликоль, криоконсерванты, такие как трегалоза и маннит, и ланолин. Подходящие фармацевтические носители описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, стандартном справочнике в данной области.

Композиции изготавливают в форме для фармацевтического введения млекопитающему, предпочтительно человеку. Такие фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены различными способами, в том числе парентерально. Термин "парентеральный" в контексте настоящей заявки включает техники подкожных, внутривенных, внутримышечных, внутрисуставных, внутрисиновиальных, интратеральных, интратекальных, внутривенных, внутрипеченочных, внутриочаговых и интракраниальных инъекций или инфузий.

Стерильные формы композиций для инъекций могут представлять собой водную или масляную суспензию. Данные суспензии могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, раствор в 1,3-бутандиоле. К числу приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, относится вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла традиционно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно применять любое нейтральное нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, подходят для получения препаратов для инъекций, также как и природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксипропиленовых вариантах. Данные масляные растворы или суспензии могут также содержать разбавитель или диспергирующий агент, представляющий собой длинноцепочечный спирт, такой как карбоксиметилцеллюлоза или схожие диспергирующие агенты, широко используемые для приготовления фармацевтически приемлемых дозированных форм, включая эмульсии и суспензии. Другие широко используемые поверхностно-активные вещества, такие как Твины, Спаны и другие эмульгаторы или усилители биологической доступности, широко используемые для получения фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других дозированных форм, также могут быть использованы для целей получения препарата. Композиции могут быть приготовлены в форме для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии.

Фармацевтические композиции могут быть введены либо в одной, либо в многократных дозах. Фармацевтическая композиция может быть введена различными способами, включая, например, ректальный, буккальный, интраназальный и трансдермальный пути. В отдельных вариантах реализации фармацевтическая композиция может быть введена путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно или подкожно.

Одним из способов введения является парентеральный, например, путем инъекции. Формы, в которые фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть включены для введения путем инъекции, включают, например, водные или масляные суспензии или эмульсии с кунжутным маслом, кукурузным маслом, хлопковым маслом или арахисовым маслом, а также эликсиры, маннит, декстрозу или стерильный водный раствор и аналогичные фармацевтические носители.

Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, трегалозу, крахмалы, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, стерильную воду, сироп и метилцеллюлозу. Препараты могут дополнительно включать смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты; эмульгаторы и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenзоаты; подсластители; и вкусоароматические добавки.



### Примеры

Следующие ниже примеры включены для демонстрации конкретных вариантов реализации настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что методы, раскрытые в приведенных ниже примерах, представляют собой методы, которые хорошо работают при практической реализации настоящего изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие конкретные варианты его реализации. Однако специалисты в данной области техники в свете настоящего раскрытия должны принять во внимание, что в конкретные раскрытые варианты реализации могут быть внесены многие изменения, и при этом, тем не менее, может быть получен аналогичный или схожий результат, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

Пример 1. Доклиническая характеристика эффективности системно вводимого агониста нескольких толл-подобных рецепторов (TLR).

В этом примере была проверена гипотеза о том, что значительное снижение без полного устранения активности ЛПС в сочетании с нейтрализацией и стабилизацией непатогенных грамотрицательных бактерий может обеспечить продукт с несколькими TLR, который может безопасно и эффективно вызывать противоопухолевые иммунные ответы при внутривенном введении.

Непатогенные грамотрицательные *E. coli* обрабатывали полимиксином В и глутаральдегидом в условиях, нейтрализующих и стабилизирующих клетки, что приводило к снижению активности эндотоксина ЛПС и пирогенности более чем на 90% ("обработанные бактерии", также называемые "бактериями-имитацией" или просто "Имитацией"). Активность и пирогенность эндотоксина определяли количественно с использованием лизата амебоцитов *Limulus* и анализов на кроликах *in vivo*. Целостность бактерий оценивали с помощью электронной и световой микроскопии. Противоопухолевую активность определяли с использованием стандартных сингенных и ксенотрансплантатных моделей опухолей.

Обработанные бактерии показали 3-кратное снижение кратковременной токсичности *in vivo* по сравнению с необработанными бактериями. Индукция секреции противоопухолевых цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МНПК) мыши и человека не была нарушена по сравнению с необработанными бактериями, что было неожиданным. Лечение обработанными бактериями (в/в) обеспечивало значительную монотерапевтическую противоопухолевую активность против ортотопической колоректальной карциномы у мышей и метастатической карциномы поджелудочной железы у мышей.

Синергическая комбинированная активность, включая ликвидацию сформировавшихся опухолей с терапевтическим индексом вплоть до 10, наблюдалась в комбинации с PL-2 или низкодозовым циклофосфамидом (LDC) на моделях колоректальной карциномы у мышей, с LDC подкожно (п/к) на модели неходжкинской лимфомы (NHL) у мышей и с LDC плюс ритуксимаб п/к на модели NHL у людей. Синергическая противоопухолевая активность также наблюдалась в комбинации с низкодозовым нестероидным противовоспалительным препаратом (НПВП) на модели метастатической карциномы поджелудочной железы у мышей. Кроме того, ликвидация опухолей наблюдалась в комбинации с НПВП и усиливалась добавлением терапии против PD1 п/к на модели гепатоцеллюлярной карциномы у мышей. Было показано, что оптимальная (80-100%) ликвидация опухоли была опосредована естественными киллерами (NK), CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Иммунологическая память (80-100% и частичная), определяемая отторжением последующей провоцирующей стимуляции опухолью, была продемонстрирована как в иммунокомпетентных, так и в только врожденных условиях, соответственно.

Пример 2. Индукция секреции цитокинов обработанными бактериями.

В этом примере была изучена способность обработанных бактерий индуцировать секрецию цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови человека.

Непатогенные грамотрицательные *E. coli* обрабатывали полимиксином В и глутаральдегидом в условиях, нейтрализующих и стабилизирующих клетки, что приводило к снижению активности эндотоксина ЛПС и пирогенности более чем на 90% ("обработанные бактерии", "бактерии-имитация" или просто "Имитация"), см.

Пример 1 и патент США № 9,265,804 В2. Активность и пирогенность эндотоксина определяли количественно с использованием лизата амебоцитов *Limulus* и анализов на кроликах *in vivo*. Целостность бактерий оценивали с помощью световой микроскопии после окрашивания по Граму.

От  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$  необработанных или обработанных бактерий с шагом приращеня в 10 раз инкубировали с  $2,5 \times 10^5$  мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) человека в культуральной среде RPMI, содержащей 2,5 мМ глутамин, 10% человеческой сыворотки и 1% пенициллина и стрептомицина при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов. Супернатанты собирали центрифугированием планшетов при 1000 об/мин в течение 10 минут и хранили при -80°C. Luminex-анализ уровней цитокинов проводили с использованием панелей Millipore Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead HCYTOMAG-60K и HSTCMAG-28SK. Уровни цитокинов интерполировали по градуировочной кривой с использованием 5-точечного нелинейного регрессионного анализа, где аппроксимация =  $(A + ((B - A) / (1 + ((B - E) / (E - A))^D)))$ . Интерполированные данные были нормированы к контролю носителем или нестимулированному контролю и проанализированы. МНПК из свежих нормальных продуктов лейкофереза периферической крови (ALLCells, Аламида, Калифорния) были выделены с использованием градиента фи-

колла (Ficoll-Paque PLUS, № по каталогу 17-144-02, плотность 1,077 +/- 0,001 г/мл от GE Healthcare Bio-Sciences, Питтсбург, Пенсильвания). Носителем для бактерий был натрий-фосфатный буфер (PBS) без кальция и с 2 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Представленные результаты представляют собой пиковые уровни, определенные для каждого цитокина с использованием одной и той же дозы необработанных или обработанных бактерий. Обработанные бактерии содержали 4,94% ЛПС от уровня необработанных бактерий, в расчете на одну бактерию, как было измерено с помощью анализа с лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ) *in vitro*.

Таблица 1

Уровень цитокинов из МНПК, индуцированных обработанными бактериями

Секреция МНПК человека <i>in vitro</i>	Необработанные бактерии	Обработанные бактерии
<b>Цитокин</b>	<b>48-часовой пик, пг/мл (среднее из трех параллельных анализов), при одной и той же дозе бактерий для каждого цитокина</b>	
ГМ-КСФ	1094	1197
IFN $\gamma$	175866	47488*
IL-1 $\beta$	11976	17651
IL-6	78422	98534
IL-8	126942	166769
IL-10	6970	7670
IL-12p70	176	528
IL-23	0	119
TNF $\alpha$	49782	77919

Представленные результаты представляют собой пиковые уровни, определенные для каждого цитокина, которые наблюдались при одинаковой дозе необработанных и обработанных бактерий, за исключением IFN $\gamma$ , который достиг пика при более низкой дозе для необработанных бактерий и сравнивался с такой же дозой обработанных бактерий.

Активность обработанных бактерий сравнивали с несколькими агонистами толл-подобных рецепторов (TLRa) и выделенным ЛПС. Эксперимент проводили, как описано в табл. 1. Агонисты толл-подобных рецепторов (TLRa) были получены от InvivoGen (Сан-Диего, Калифорния) и титрованы в эксперименте следующим образом; CpG ODN 2006 (№ tlr-2006, от 0,005 до 5 микромоляр), поли(I:C) (№ tlr-pic, от 0,001 до 100 микрограмм/мл), R848 (№ tlr-r848, от 0,1 до 100 микрограмм/мл) и ЛПС *E. coli* (№ tlr-pb5лпс, от 10 до 1 $\times$ 10<sup>6</sup> пикограмм/мл). Исходные растворы агонистов TLR были приготовлены в соответствии с рекомендациями производителя в пределах их рекомендуемых пределов растворимости, и результаты представляют собой пиковые уровни цитокинов, определенные для каждого TLRa и обработанных бактерий. Результаты представлены в приведенной ниже табл. 2.

Таблица 2

Индукция цитокинов по сравнению с отдельными агонистами TLR

	СрG ODN (TLR9a)	Поли(I:C) (TLR3a)	R848 (TLR 7/8a)	ЛПС (TLR4a)	Обработанные бактерии
<b>Цитокин</b>	<b>пг/мл (среднее значение пика полной кривой титрования)</b>				
ГМ-КСФ	0	0	87	175	1197
IFN $\gamma$	7	103	31324	29416	91475
IL-1 $\beta$	1	22	9990	4631	17651
IL-6	241	129	40555	54174	98534
IL-8	2436	1452	116135	143459	166769
IL-10	374	8	940	3542	7670
IL-12p70	4	18	253	109	528
TNF $\alpha$	51	208	33393	24944	77919

Пример 3. Тестирование лечения вирусной инфекции обработанными бактериями на животных.

В этом примере были протестированы обработанные бактерии, которые могут быть получены, как показано в Примерах 1 и 2, в отношении их активности при лечении вирусных инфекций у животных.

Модели инфекции гепатита В (HBV) на животных, используемые в этом примере, могут представлять собой любые из следующих: модель гидродинамической инъекции, модель на FVB/N, модель с аденовирусной доставкой, модель с аденоассоциированным вирусом, модель инфекции вирусом гепатита

сурков, модель на шимпанзе, модель на тупаях, модель HBV-трансгенной мыши, модель на HBV-Tg1mega и химерная модель с печенью человека. Подходящие модели ВИЧ на животных также могут быть использованы для тестирования активности обработанных бактерий в отношении профилактики или лечения инфекции ВИЧ.

Препараты обработанных бактерий с общей величиной активности ЛПС согласно измерениям с помощью анализа с лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ) *in vitro* в различных диапазонах вводят животным, инфицированным вирусом или экспрессирующим вирусные гены. У некоторых животных в качестве комбинированной терапии будут использованы дополнительные иммуностимулирующие или противовирусные агенты. Животных, не получавших лечения, и животных, получавших другие иммуностимулирующие или противовирусные агенты, использовали в качестве контроля. Предполагается, что обработанные бактерии проявляют эффективную противовирусную активность в этих моделях на животных.

Пример 4. Ингибирование HBV у мышей.

Аденоассоциированный вирус/вирус гепатита В (AAV/HBV) представляет собой рекомбинантный AAV, несущий реплицируемый геном HBV человека. Используя преимущество высокой гепатотропности AAV генотипа 8, геном HBV человека может быть эффективно доставлен в клетки печени мыши. Инфицирование иммунокомпетентных мышей AAV/HBV может привести к длительной виремии HBV, в том числе высвобождению вирионов HBV человека, HBsAg и HBeAg в кровь, что имитирует хроническую инфекцию HBV у пациентов. Модель AAV/HBV может быть использована для оценки *in vivo* активности различных типов агентов против HBV. Кроме того, эта модель является подходящей для оценки иммуномодуляторов (см., например, Huang et al., *Int. J. Onc.* v39 pp1511-1519, 2011).

гAAV8-1.3HBV, генотип D, был приобретен в Пекинском институте молекулярной медицины Five-Plus (номер партии A2018092406). Исходный раствор вируса с  $1 \times 10^{12}$  вирусных геномов (в.г.)/мл разбавляли до  $5 \times 10^{11}$  в.г./мл стерильным натрий-фосфатным буфером (PBS) и  $1 \times 10^{11}$  в.г. AAV/HBV в 200 мкл инъецировали самцам мышей C57BL/6 в возрасте 5 недель за 31 день до начала введения доз (день -31).

Образцы крови (-100 мкл) брали в пробирки, покрытые K2-EDTA, через кровотоечение из поднижечелюстной области в дни -17, -7 и -4. Образцы центрифугировали при 7000 g (4°C) в течение 10 минут для сбора плазмы. Готовили по меньшей мере 40 мкл образцов плазмы для определения уровня ДНК HBV с помощью кПЦР и уровней антигена HBs (HBsAg) и антигена HBe (HBeAg) с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA). Оставшиеся образцы плазмы хранили при -80°C для анализов после умерщвления. На основании уровней ДНК HBV, HBsAg, HBeAg в плазме и массы тела в дни -17, -7 и -4 были отобраны мыши с подходящими уровнями вирусной инфекции и случайным образом разделены на 7 групп по 5 мышей в каждой группе в день -1. Все мыши были равномерно распределены в каждой группе, чтобы гарантировать отсутствие значительных различий между каждой группой с точки зрения уровня ДНК HBV, HBsAg, HBeAg и массы тела в день -4.

Бактерии-имитацию получали, как описано в Примере 1 и в патенте США № 9,265,804 B2, с диапазоном активности ЛПС-эндотоксина приблизительно от 2000 до 6000 единиц эндотоксина (ЕЭ) или приблизительно от 250 до 750 нг ЛПС на  $10^9$  нейтрализованных бактериальных клеток. Группы животных не получали лечения, получали энтекавир (ETV) в дозе 0,005 мг/кг перорально (п/о) ежедневно в дни 0-34, Имитацию в дозе  $2 \times 10^8$  нейтрализованных бактерий на мыш, вводимых в хвостовую вену в/в в дни 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23, 29 и 30, или ETV и Имитацию. Образцы плазмы получали еженедельно и анализировали на ДНК HBV, HBsAg и HBeAg, как описано выше. Уровни ДНК HBV (копии), HBsAg и HBeAg у мышей из получавших лечение групп сравнивали с уровнями в группе без лечения в каждой сопоставимой временной точке с помощью непарного, непараметрического статистического анализа Манна-Уитни.

Фиг. 1 демонстрирует, что терапия по стандарту оказания медицинской помощи (ETV) значительно ингибировала продукцию ДНК HBV в течение 3 дней после начала введения доз, снижая уровень в плазме у 5/5 мышей до нижнего предела количественного определения (120 копий/мкл плазмы) на 28 день ежедневного введения доз (день 59 после инфицирования) (Фиг. 1B). Имитация также значительно ингибировала продукцию ДНК HBV, снижая уровень в плазме у 3/5 мышей до нижнего предела количественного определения на 28 день введения доз дважды в неделю (день 59 после инфицирования) (Фиг. 1C). Ингибирование ДНК HBV посредством ETV + Имитации было аналогично действию ETV в отдельности, что демонстрирует отсутствие антагонистического взаимодействия до этого момента при введении соединения (Фиг. 1D).

При введении ETV не наблюдалось ингибирования продукции HBsAg или HBeAg. Однако было обнаружено, что Имитация ингибировала продукцию HBeAg на 28 день введения доз (день 59 после инфицирования) (Фиг. 2).

Таким образом, этот пример демонстрирует, что, как и в случае со стандартом оказания медицинской помощи (ETV), бактерии-имитация также могут значительно ингибировать репликацию HBV, хотя бактериям-имитации требуется больше времени, чтобы проявить ингибирующую активность, что согласуется с иммунологической основой механизма действия Имитации. Однако, в отличие от ETV, который

ингибировал только продукцию ДНК HBV, бактерии-имитация также обладают преимуществом ингибирования продукции антигена HBe.

Пример 5. Долгосрочное ингибирование HBV.

Этот эксперимент был проведен для того, чтобы определить, может ли нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП) усилить противовирусную активность бактерий-имитации, если противовирусная активность Имитации теряется после прекращения лечения, и потенциальные токсические эффекты лечения ETV, Имитацией и ETV + Имитация. Эксперимент проводили, как описано в Примере 4, за исключением того, что вирус AAV/HBV инъецировали в день -29 относительно начала введения доз. Уровни ДНК HBV, HBsAg и HBeAg в плазме определяли в дни -15, -8 и -1 относительно начала введения доз в день 0, и дозу ETV увеличивали до 0,1 мг/кг. Кроме того, всем группам, представленным на фиг. 3, 4, 5 и 6, ежедневно вводили индометацин (НПВП) (10 мкг/мл в питьевой воде). Введение доз осуществляли в течение 5 недель, как в Примере 4, при этом уровни ДНК HBV, HBsAg и HBeAg в плазме определяли еженедельно, а также раз в две недели в течение 27 недель после прекращения лечения. Ингибирующую активность определяли путем сравнения получавших лечение групп в каждой временной точке с контрольной группой (индометацин по отдельности) в той же временной точке с помощью непарного, непараметрического статистического анализа Манна-Уитни.

По окончании эксперимента печень каждой мыши была разделена на несколько срезов, мгновенно заморожена в жидком азоте сразу же после сбора и хранилась при -80°C. Срезы печени использовали для обнаружения ДНК HBV, а дополнительные срезы печени от каждой мыши фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF) в течение приблизительно 24 часов, затем переносили для стандартной дегидратации и заливки парафином. Парафиновые блоки были разделены на срезы для окрашивания гематоксилин-эозином (H&E) и гистопатологического анализа, а также иммуногистохимического анализа (ИГХ) на HBsAg и HBcAg.

Фиг. 3А демонстрирует, что индометацин по отдельности не ингибировал продукцию ДНК HBV. В то же время, фиг. 3 (В, С и D) демонстрирует, что ETV, Имитация или ETV + Имитация ингибировали продукцию ДНК HBV в присутствии индометацина аналогично тому, как это наблюдалось в отсутствие индометацина (Фиг. 1). При лечении ETV потери массы тела не наблюдалось. Временная потеря массы тела, составившая 6% в течение одного дня, наблюдалась в течение 1 недели лечения Имитацией ( $\pm$ ETV), 1,3% (без ETV) и 3,4% (+ETV) в течение одного дня в течение 2 недели лечения Имитацией, 0,8% (без ETV) и 2,0% (+ETV) в течение одного дня в течение третьей недели лечения, и никакой потери массы тела не наблюдалось в течение четвертой и пятой недель лечения Имитацией ( $\pm$ ETV).

Статистически значимое ингибирование ДНК HBV было утрачено по окончании эксперимента (день 253), через 27 недель после прекращения лечения ETV (Фиг. 3В), но ингибирование оставалось статистически значимым на 253 день в группах, получавших Имитацию (Фиг. 3С) и Имитацию + ETV (Фиг. 3D). Это демонстрирует, что Имитация обладают более продолжительным ингибирующим эффектом в сравнении с ETV.

Индометацин + ETV не ингибировали HBsAg или HBeAg по сравнению с индометацином по отдельности (Фиг. 4А, В и 5А, В). Однако добавление Имитации (т.е. индометацин + Имитация или индометацин + Имитация + ETV) ингибировало продукцию HBsAg и HBeAg по сравнению с индометацином по отдельности (Фиг. 4А, С, D и 5 А С, D). Поскольку ни Имитация по отдельности, ни индометацин по отдельности не ингибировали продукцию HBsAg, эти результаты демонстрируют синергическое взаимодействие между Имитацией и индометацином в отношении ингибирования HBsAg.

Фиг. 6 демонстрирует, что в присутствии индометацина Имитация или Имитация + ETV, но не ETV, ингибировали экспрессию HBeAg в печени мышей через 27 недель после прекращения лечения. На фиг. 7 представлен ИГХ анализ экспрессии HBcAg в печени мышей, получавших носитель Имитации (т.е. только буфер, использованный в композиции Имитации) и соединение. Комбинация индометацина и Имитации снова снижала экспрессию HBcAg у 2 из 5 мышей по сравнению с индометацином по отдельности, а комбинация индометацина, Имитации и ETV снижала экспрессию HBcAg у 5 из 5 мышей по сравнению с лечением индометацином + ETV или индометацином + Имитация.

Этот пример демонстрирует, что НПВП, такие как индометацин, неспособны ингибировать HBV, но могут значительно усиливать противовирусную активность бактерий-имитации синергическим образом. По сравнению со стандартом оказания медицинской помощи ETV бактерии-имитация демонстрировали более длительный и устойчивый лечебный эффект. Комбинация Имитации и ETV привела к значительному улучшению по сравнению с каждым лечением в отдельности, в частности, в отношении долгосрочного наблюдения после прекращения лечения.

Пример 6. Ингибирование инфекции ВИЧ.

Чтобы изучить способность бактерий-имитации ингибировать инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) *in vivo*, иммунная система человека была воспроизведена у NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$ null-специфичных самок мышей с иммунодефицитом (NCG) (Charles River) с помощью гемопоэтических стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови человека. Мышам приживляли полученные из пуповинной крови CD34+ гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (Француз-

ский институт крови) после миелоаблативной химиотерапии (Manfroi et al., Can. Res. v77, pp1097-1107 2017). Приживление заключалось во внутривенной инъекции 105 CD34+ клеток. Уровень приживления контролировали с помощью анализа на человеческие CD45+ клетки среди всех лейкоцитов крови методом проточной цитометрии.

Через 14 недель приживления подходящим hu-мышам инокулировали 80 нг ВИЧ-1 (NL4-3 HIV1/Clade B; X4-тропный вирус) путем в/б инъекции. Виремию плазмы определяли на 5 неделе с помощью кПЦР в реальном времени. Другие методы были такими, как описано в Wenzel et al., J. Virol. Doi:10.1128/JVI.00907-19 (принятая рукопись опубликована онлайн 2 августа 2019 г.). В эксперименте использовали только ВИЧ-мышей с вирусной нагрузкой более  $10^4$  копий/мл. На 5 неделе мышей случайным образом разделяли на группы на основе степени их гуманизации, нагрузки ВИЧ и процентного содержания CD4+ Т-клеток в крови.

Группы получали носитель Имитации в/в дважды в неделю в течение 5 недель, высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ или три-терапия), состоящую из 2,4 мг ламивудина, 2,35 мг тенофовира дизопроксила и 19,2 мг ралтегравира в сутки, добавленных в гранулы корма, в течение 6 недель, или нейтрализованные бактерии-имитацию (полученные, как описано в Примере 4),  $6 \times 10^7$  в/в (хвостовая вена) два раза в неделю в течение 5 недель.

Кровь (100 мкл) брали раз в две недели из ретроорбитального синуса в пробирки, покрытые EDTA. Плазму отделяли от клеток центрифугированием и инкубировали 30 мин при 56°C для инактивации ВИЧ перед замораживанием при -80 °C. Вирусные РНК выделяли из 40 мкл замороженной инактивированной плазмы с использованием автоматического устройства для очистки нуклеиновых кислот (Agrow, NorDiag) и набора для экстракции вирусной РНК (DiaSorin, № 12-08-02). Вирусную нагрузку ВИЧ в плазме определяли с помощью кПЦР в реальном времени с использованием набора "Generic HIV Charge Virale" (Biocentric, № TR001-4401C, партия 0089/08A). Предел чувствительности был установлен на уровне 1000 копий/мл. Значения ниже этого порога считались необнаруженными. Ингибирующую активность определяли путем сравнения получавших лечение групп в каждой временной точке с группой, получавшей носитель, в той же временной точке с помощью непарного, непараметрического статистического анализа Манна-Уитни. Символы звездочки обозначают статистически значимое ингибирование.

Фиг. 8 демонстрирует, что терапия ВААРТ ингибировала уровни ВИЧ в крови через две недели после начала лечения и в течение трех недель после прекращения лечения (Фиг. 8В). Бактерии-имитация не ингибировала уровни ВИЧ во время лечения, но ингибирование наблюдалось, начиная через четыре недели после прекращения лечения и продолжалось в течение одиннадцати недель, за исключением 19 недели (Фиг. 8С). Отсроченный ингибирующий ответ дает основания полагать, что бактерии-имитация были способны вызывать иммунный ответ против инфекции ВИЧ. По одной смерти мыши было зарегистрировано в группе, получавшей носитель Имитации, и в группе, получавшей лечение ВААРТ. В группе, получавшей лечение Имитацией, смертей не наблюдалось.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение.

Изобретения, наглядно описанные в настоящей заявке, могут быть подходящим образом реализованы в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в настоящей заявке. Таким образом, например, термины "содержащий", "включающий" и т. д. следует понимать в широком смысле и без ограничения. Кроме того, употребляемые в настоящей заявке термины и выражения используются в качестве описывающих и не ограничивающих терминов, и использование таких терминов и выражений не подразумевает исключения каких-либо эквивалентов показанных и описанных признаков или их частей, и подразумевается, что различные модификации возможны в пределах объема заявленного изобретения.

Таким образом, следует понимать, что несмотря на то, что настоящее изобретение было специально описано с помощью предпочтительных вариантов реализации и необязательных признаков, специалист в данной области техники может прибегнуть к модификации, улучшению и вариации изобретений, раскрытых в настоящей заявке, и такие модификации, улучшения и вариации считаются входящими в объем данного изобретения. Материалы, методы и примеры, представленные в настоящей заявке, представляют собой предпочтительные варианты реализации, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Изобретение было описано в настоящей заявке широко и в общих чертах. Каждый из более узких видовых признаков и подродовых групп признаков, подпадающих под общее раскрытие, также составляет часть настоящего изобретения. Это включает в себя общее описание изобретения с условием или отрицательным ограничением, исключаящим любой объект из рода, независимо от того, упомянут ли исключенный признак в настоящей заявке конкретно.

Кроме того, если признаки или аспекты настоящего изобретения описаны с помощью групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет ясно, что настоящего изобретение также таким образом описано с помощью любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, упомянутые в настоящей заявке, прямо включены посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждый из них был включен посредством ссылки по отдельности. В случае противоречия преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения.

Следует понимать, что, хотя настоящего изобретение было описано в связи с вышеупомянутыми вариантами реализации, вышеприведенное описание и примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в пределах объема настоящего изобретения будут понятны специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции для производства лекарственного средства для профилактики или лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом пациента, при этом указанная композиция содержит множество интактных и по существу нежизнеспособных грамотрицательных бактериальных клеток, которые были обработаны таким образом, чтобы привести к снижению активности липополисахарид (ЛПС)-ассоциированного эндотоксина на 75-99% при измерении с помощью анализа с лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ) по сравнению с необработанными грамотрицательными бактериальными клетками дикого типа, причём указанные бактериальные клетки представляют собой клетки *Salmonella* или *Escherichia*, и при этом указанная обработка представляет собой обработку полимиксином при температуре от 2°C до 10°C и глутаральдегидом.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанная композиция содержит от 0,01 до 100 нг, предпочтительно от 0,02 до 20 нг, более предпочтительно от 0,1 до 10 нг активного ЛПС на кг массы тела указанного пациента.

3. Применение по п.1 или п.2, отличающееся тем, что указанная композиция содержит от 2 до 200 нг, предпочтительно от 10 до 120 нг, более предпочтительно от 20 до 100 нг активного ЛПС на  $1 \times 10^8$  клеток.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанные интактные и по существу нежизнеспособные грамотрицательные бактериальные клетки были обработаны таким образом, чтобы привести к снижению уровня ЛПС-ассоциированного эндотоксина на 85-98%, предпочтительно на 90%-98%.

5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанная вирусная инфекция вызвана вирусом гепатита В (HBV) или вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

6. Применение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанная композиция дополнительно содержит второй терапевтический агент, причём указанный второй терапевтический агент:

а) представляет собой ингибитор циклооксигеназы, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из 6MNA (6-метокси-2 нафтилуксусная кислота), аспирина, карпрофена, диклофенака, фенпрофена, флуфенамата, флублипрофена, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, кеторолака, меклофенамата, мефенаминовой кислоты, напроксена, нифлумовой кислоты, пироксикама, сульфида сулиндака, супрофена, тенидапа, толметина, томоксипрола, зомегирака, целекоксиба, этодолака, мелоксикама, нимесулида, диизопропилфторфосфата, L745,337, NS398, рофекоксиба, SC58125, S-аминосалициловой кислоты, ампирина, дифлунизала, набуметона, парацетамола, ресвератрола, салицина, салицилового альдегида, салицилата натрия, сульфасалазина, сулиндака, тамоксифена, тиклопидина, валерил-салицилата и их комбинаций;

б) представляет собой агонист стимулирующей иммунной контрольной точки, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR и ICOS;

с) представляет собой антагонист ингибирующей иммунной контрольной точки, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из A2AR, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, PD-L1, TIM-3 и VISTA;

д) выбран из группы, состоящей из абакавира, ацикловира, адефовира, амантадина, ампренавира, амплигена, арбидола, атазанавира, атрипла, балавира, цидофовира, комбивира, долутегавира, дарунавира, делавиридина, диданозина, докозанола, эдоксудина, эфавиренза, эмтрицитабина, энфувиртида, энтекавира, эколивера, фамцикловира, фомивирсена, фосампренавира, фоскарнета, фосфонета, ганцикловира, ибацитабина, имуновира, идоксуридина, имиквимода, индинавира, инозина, ингибитора интегразы, интерферона III типа, интерферона II типа, интерферона I типа, интерферона, ламивудина, лопинавира, лопивирида, маравирока, мороксидина, метисазона, нелфинавира, неврапина, нексавира, нитазоксанида, аналогов нуклеозидов, норвира, осельтамивира (Tamiflu®), пегинтерферона альфа-2а, пенцикловира, перамивира, плеконарида, подофиллотоксина, ингибитора протеазы, ралтегавира, рибавирина, римантадина, ритонавира, пирамидина, саквинавира, софосбувира, ставудина, теллапревира, тенофовира, тенофовира дизопроксила, типранавира, трифлуридина, тривизвира, тромантадина, трувады, валацикловира, валганцикловира, викривирока, видарабина, вирамидина, зальцитабина, занамивира, зидовудина и их комбинаций; или

е) представляет собой интерферон альфа или пегилированный интерферон.

7. Применение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанные грамотрицательные бакте-

риальные клетки содержат интегрированный или экзогенный полинуклеотид, кодирующий патоген-специфичный антиген или белок, стимулирующий иммунную систему.

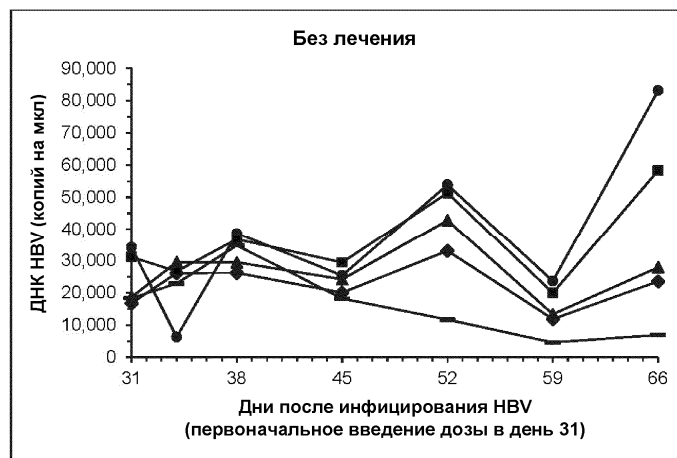
8. Применение по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное введение начинают в течение 24 часов после инфицирования или в течение 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней после инфицирования.

9. Применение по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное введение начинают через по меньшей мере 24 часа после инфицирования или через по меньшей мере 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после инфицирования.

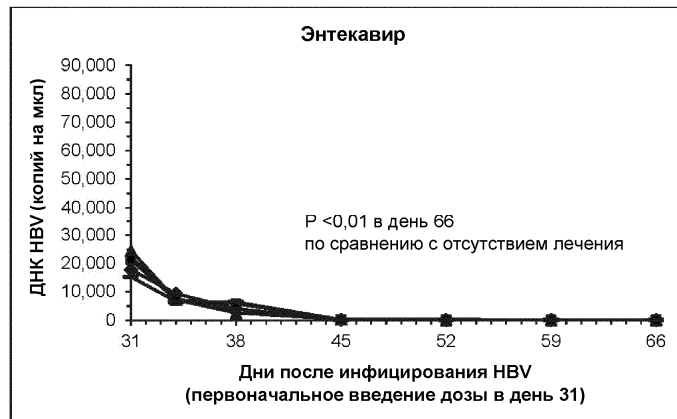
10. Применение по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что по меньшей мере 90%, 95% или 100% бактериальных клеток являются нежизнеспособными.

11. Применение по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что обработку осуществляют полимиксином, предпочтительно полимиксином В или полимиксином Е, при этом предпочтительно обработку осуществляют при температуре от 2°C до 10°C, предпочтительно при 4°C.

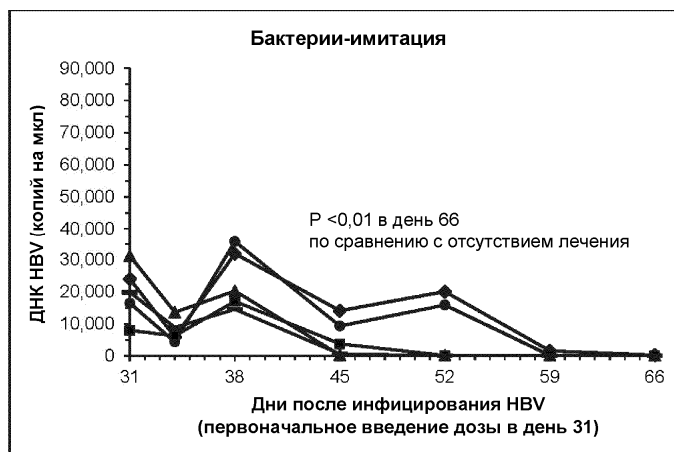
12. Применение по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что обработку осуществляют полимиксином и глутаральдегидом, при этом предпочтительно обработку осуществляют полимиксином В в диапазоне доз от 3 мкг/мл до 1000 мкг/мл и глутаральдегидом в диапазоне доз от 0,1% до 1,0%.



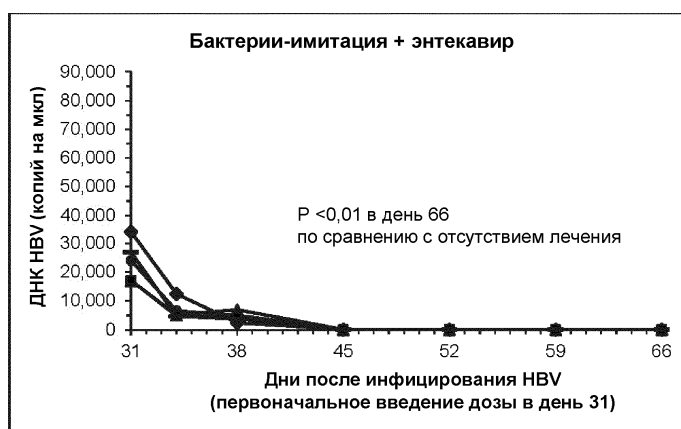
Фиг. 1А



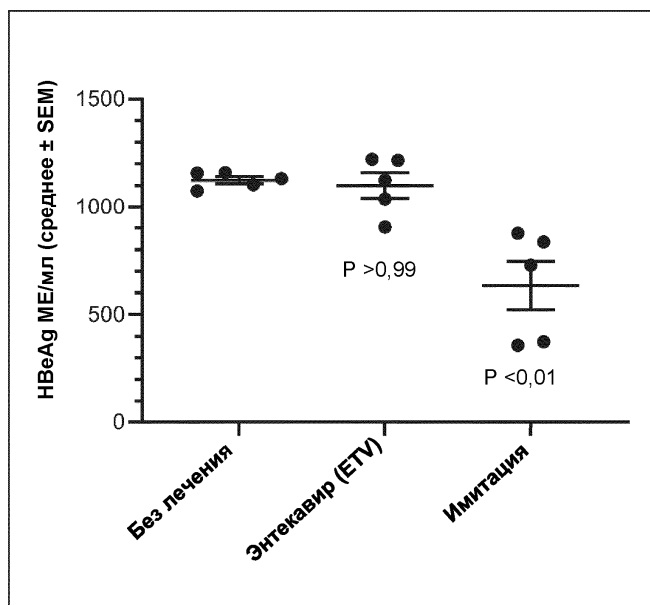
Фиг. 1В



Фиг. 1С

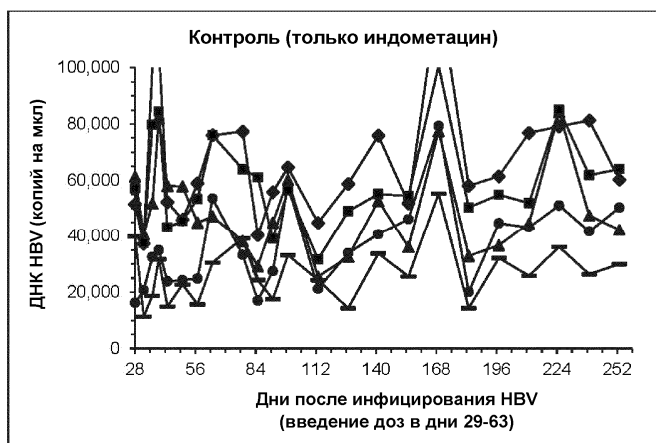


Фиг. 1D

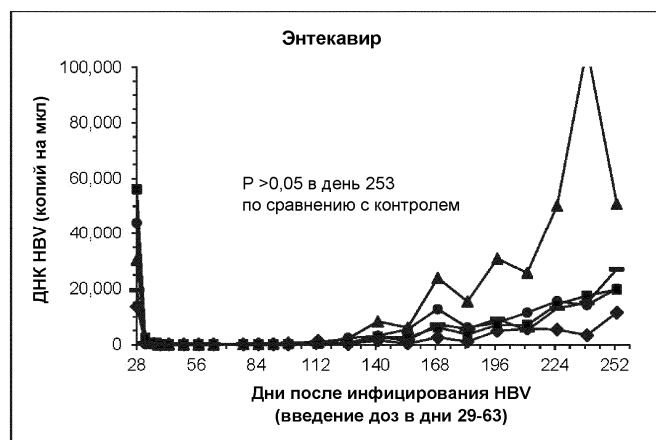


Фиг. 2

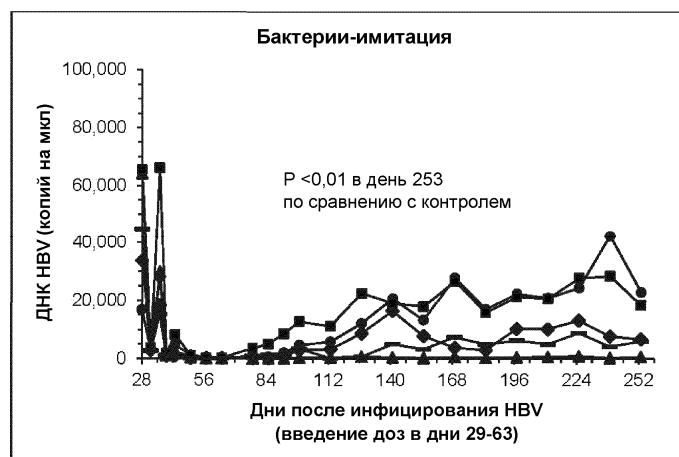




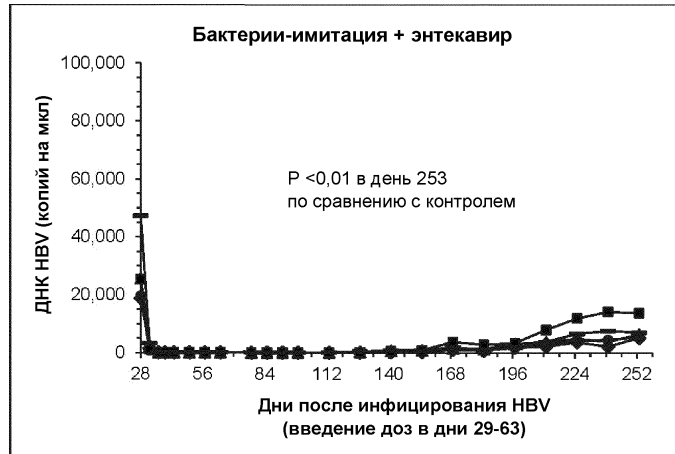
Фиг. 3А



Фиг. 3В



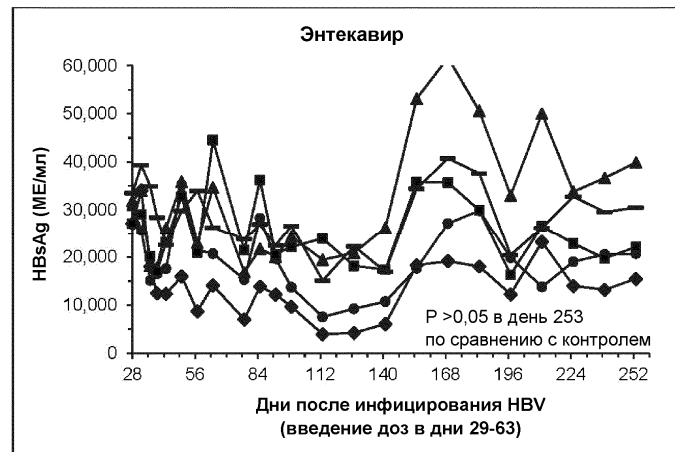
Фиг. 3С



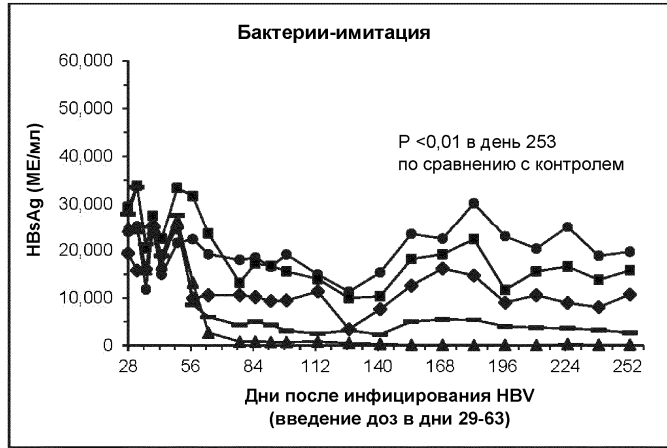
Фиг. 3D



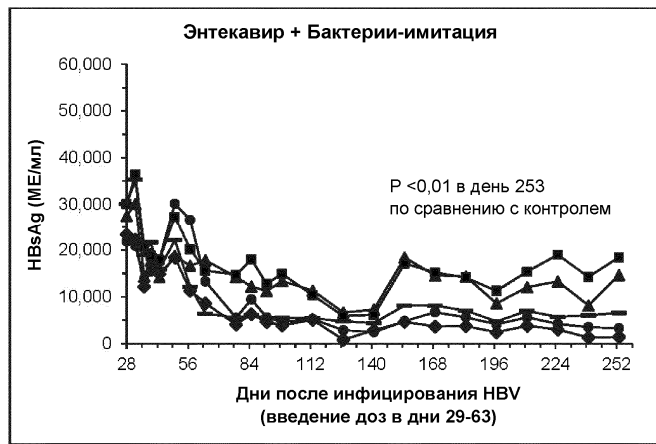
Фиг. 4А



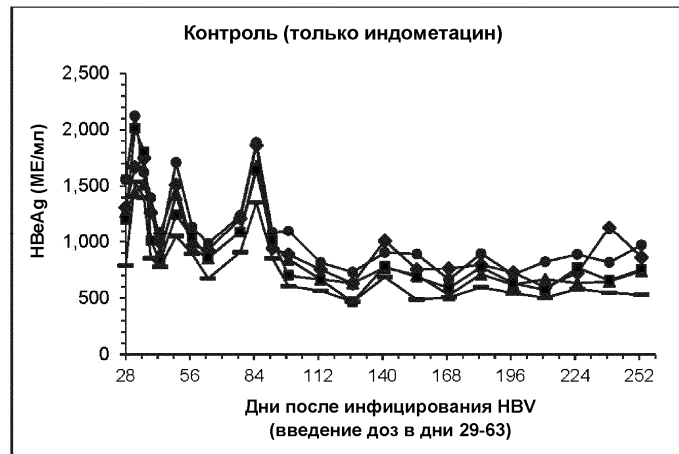
Фиг. 4В



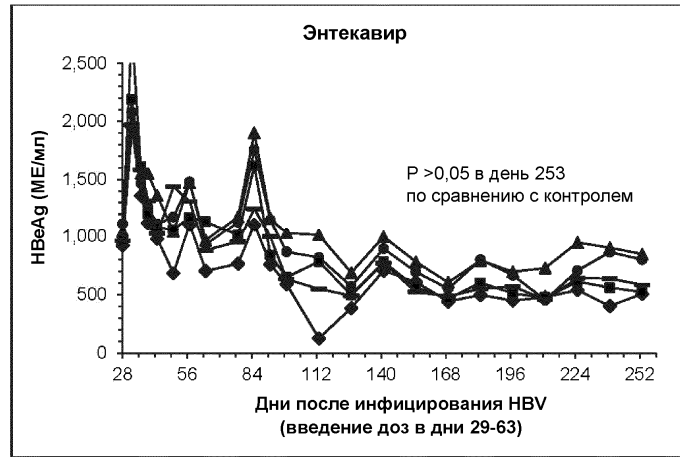
Фиг. 4С



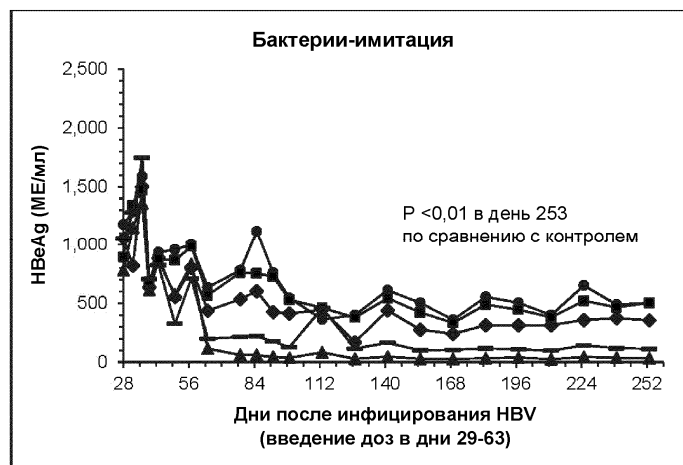
Фиг. 4D



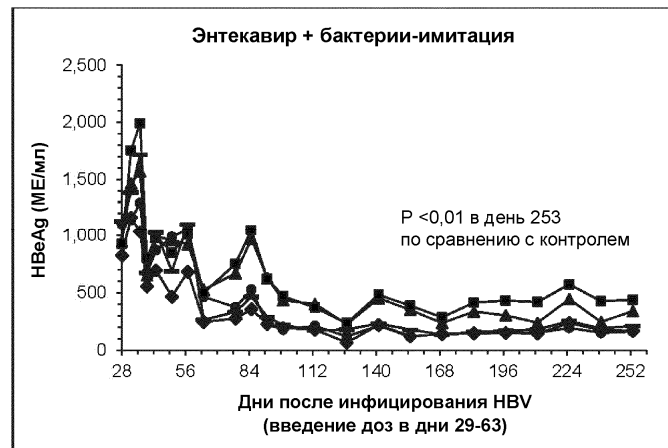
Фиг. 5А



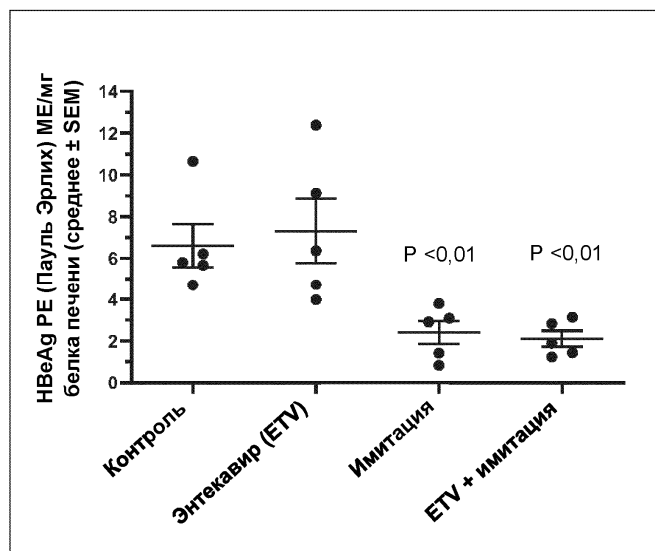
Фиг. 5B



Фиг. 5C

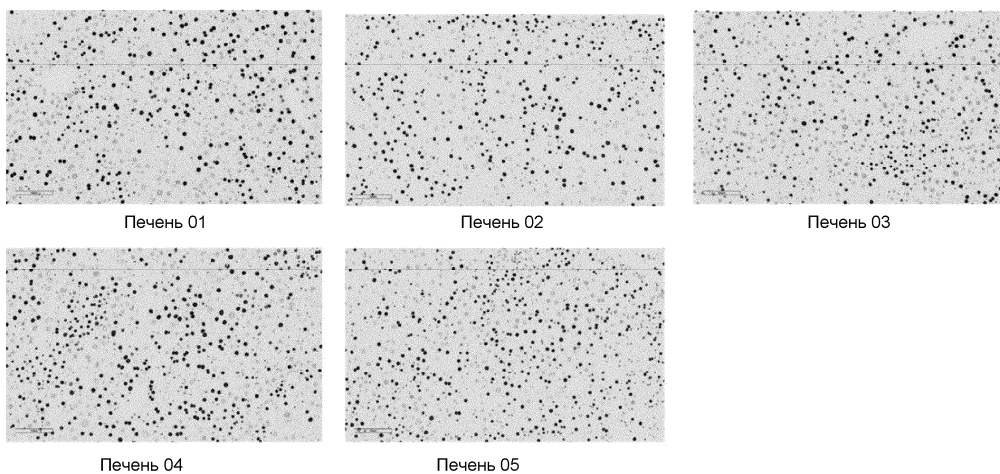


Фиг. 5D



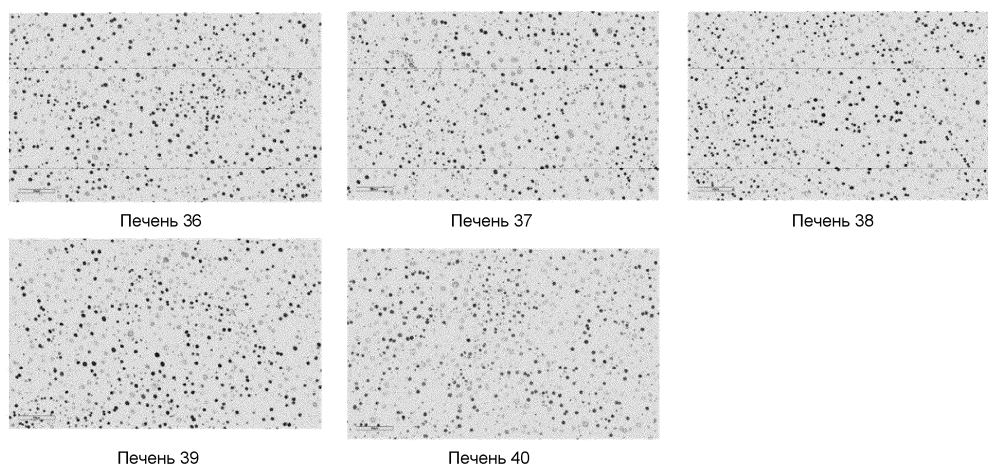
Фиг. 6

## Носитель



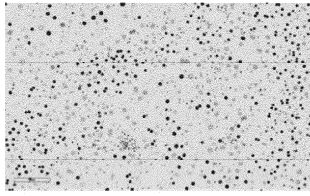
Фиг. 7А

## Энтекавир

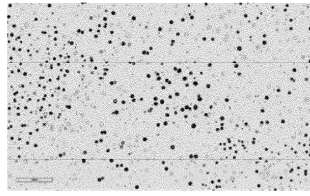


Фиг. 7В

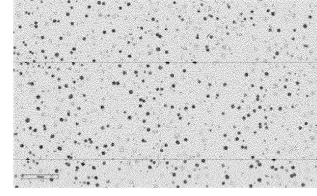
**Индометацин**



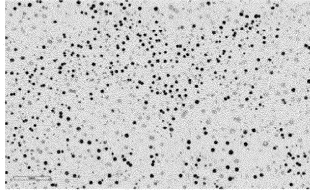
Печень 06



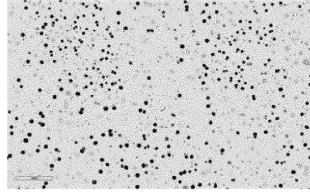
Печень 07



Печень 08



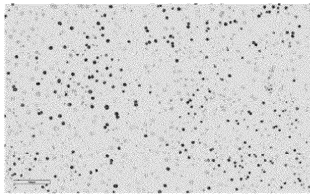
Печень 09



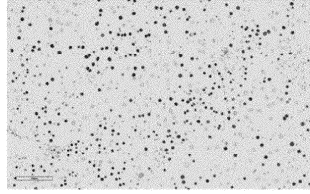
Печень 10

**Фиг. 7С**

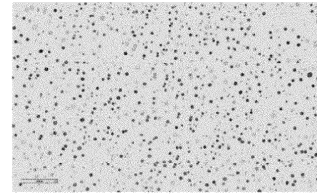
**Индометацин + энтекавир**



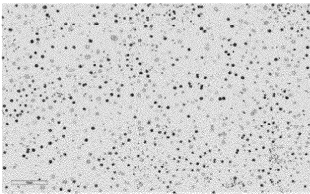
Печень 21



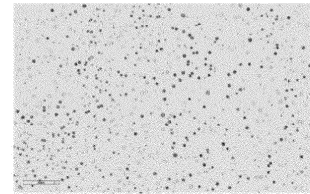
Печень 22



Печень 23



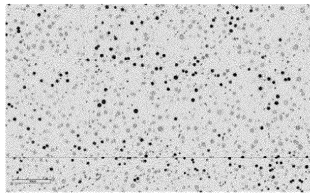
Печень 24



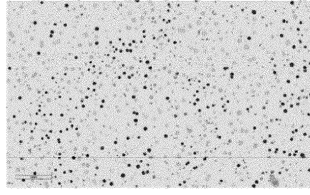
Печень 25

**Фиг. 7D**

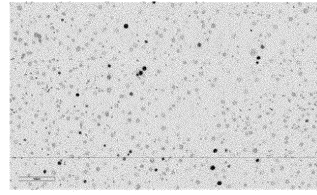
**Индометацин + бактерии-имитация**



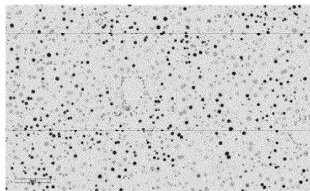
Печень 16



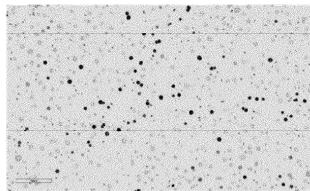
Печень 17



Печень 18



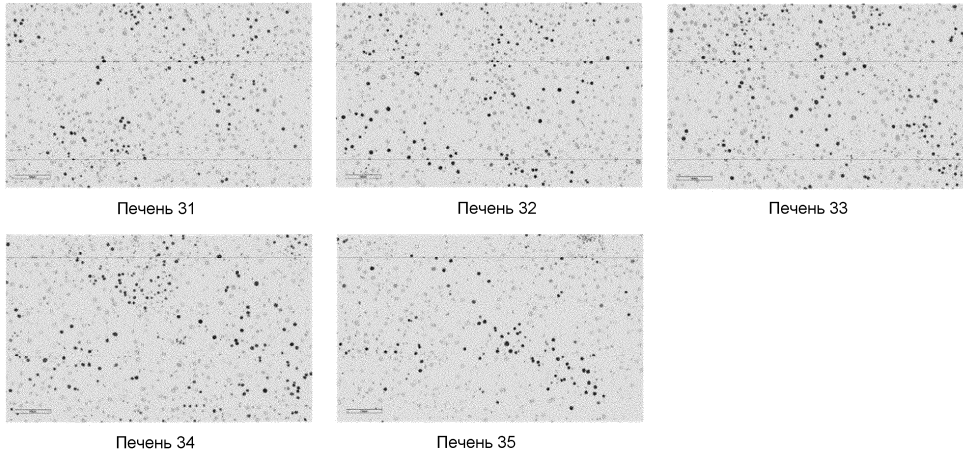
Печень 19



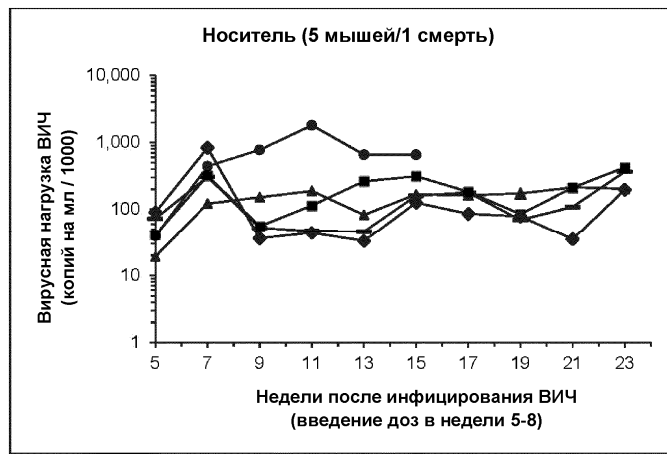
Печень 20

**Фиг. 7E**

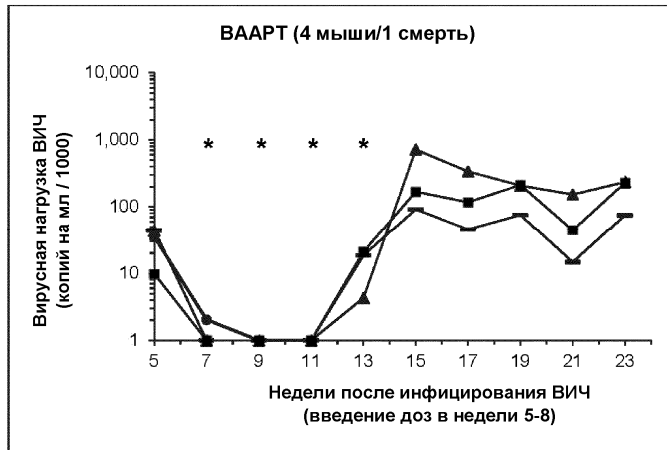
Индометацин + бактерии-имитация + энтекавир



Фиг. 7F



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С

