

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034194**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.16

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201690309

(22) Дата подачи заявки
2014.08.01

**(54) ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

(31) CU-2013-0110

(56) WO-A2-0245746

(32) 2013.08.02

(33) CU

(43) 2016.06.30

(86) PCT/CU2014/000004

(87) WO 2015/014327 2015.02.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИА
МОЛЕКУЛАР (CU)**

(72) Изобретатель:
**Санчес Рамирес Белинда, Иглесиас
Ривера Арианна, Гутьеррес Перес
Амелия, Гонсалес Суарес Нархара
(CU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к вакцинной композиции, содержащей в равных пропорциях внеклеточные домены (ECD) рецепторов Her1 и Her2 в диапазоне концентраций от 100 до 800 мкг/дозу и протеолипосомы очень малого размера, полученные из белков наружной мембраны *Neisseria meningitidis* и ганглиозида GM3 (VSSP-GM3), для индукции иммунного ответа против злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2, а также к применению указанной вакцинной композиции и способу лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2.

034194 B1

034194 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и иммунологии применительно к здоровью человека. Конкретно оно относится к вакцинному составу для лечения злокачественных опухолей.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Рецепторы Her1 и Her2 представляют собой трансмембранные гликопротеины с тирозинкиназной активностью, принадлежащие к семейству рецепторов, известному как семейство ErbB (Normanno N., et al. (2005) *Curr. Drug. Targets* 6, (3): 243-257). Her1 сверхэкспрессирован в опухолях легких, молочных желез, головы и шеи, колоректальных опухолях, опухолях поджелудочной железы, мочевого пузыря, яичников и глиобlastомах (T.M. Brand, et al., (2011) *Cancer Biol. Ther.* 11 (9): 777-792); (Zhou H.Y. et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, (26): 15152-15157; Liu X.H., et al., (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77 (6): 1472-1478; Neal D.E., et al., (1985) *Lancet* 1 (8425): 366-368; Gullick W.J., et al., *Cancer Res.* 46 (1): 285-292; Salomon D.S., et al., (1995) *Crit Rev Oncol Hematol* 19 (3): 183-232). Сверхэкспрессия Her1 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при опухолях головы и шеи и раке легких, с высоким риском рецидивов заболеваний (Turkeri L.N. et al., (1998) *Urology* 51 (4): 645-649; Chow N.H., et al., (1997) *Anticancer Res.* 17 (2B): 1293-1296) и со сниженной выживаемостью пациентов с раком яичников, кишечника, мочевого пузыря, щитовидной железы и головы и шеи (Grandis et al., (1998) *J. Cell. Biochem Suppl.* 69 (1):55-62).

Кроме того, уровни экспрессии Her1 коррелирует с устойчивостью к общепринятым терапевтическим средствам (Holbro T., et al., (2003) *Exp. Cell. Res.* 284 (1): 99-110). Аномальная экспрессия рецептора Her2 по сравнению с экспрессией в нормальных тканях также выявлена в опухолях молочной железы, желудка, яичников и предстательной железы (Tai W. et al., (2010) *J. Control Release* 146 (3): 264-275). Кроме того, нарушение регуляции этого рецептора наблюдали при злокачественной трансформации дыхательных путей (Andrade Filho et al., 2010), и оно является механизмом устойчивости опухолей к терапевтическим средствам против Her1 (Brand et al., (2011) *Cancer Biol. Ther.* 11 (9): 777-792). Сверхэкспрессия Her2 в опухолях молочной железы коррелировала с более низкой общей выживаемостью и выживаемостью без рецидивов.

Во многих из указанных выше опухолей наблюдают высокий уровень коэкспрессии Her1 и Her2, и сверхэкспрессия обоих рецепторов связана со сниженной выживаемостью пациентов ((Wiseman S.M., et al., (2005) *Cancer*. May 1; 103(9): 1770-7). У пациентов с положительным по Her2 раком молочной железы существует высокий риск смертности, ассоциированный с заболеванием, и, кроме того, коэкспрессия Her1 и Her2 в этих опухолях значительно повышает этот риск, что свидетельствует о том, что экспрессия Her1 в этих карциномах оказывает синергическое действие на экспрессию Her2 (Suo Z. et al., (2002) *J. Pathol.* 196 (1): 17-25). Экспериментально продемонстрировано, что существует синергическое взаимодействие между этими рецепторами при злокачественной трансформации клеток (Kokai Y. et al., (1989) *Cell* 58 (2): 287-292). Другие примеры опухолей, в которых выявлена коэкспрессия Her1 и Her2, представляют собой злокачественные опухоли головного мозга, яичников, головы и шеи, легких, пищевода и толстого кишечника (Emanuel S.L. et al., (2008) *Mol. Pharmacol.* 73 (2): 338-348; Ako E. et al., (2007) *Oncol. Rep.* 17 (4): 887-893; Venkateswarlu S. et al., (2002) *Oncogene* 21 (1): 78-86).

В литературе хорошо описана физиологическая роль аномальной экспрессии и коэкспрессии рецепторов Her1 и Her2 в опухолях. Посредством формирования димеров и гетеродимеров (Pinkas-Kramarski R. et al., (1996) *EMBO J.* 15 (10): 2452-2467) эти рецепторы регулируют важные процессы в биологии опухоли, такие как непрерывная пролиферация, ангиогенез, ингибирование апоптоза, перепрограммирование метаболизма, способность к инвазии и метастазированию (Hanahan D. et al. (2011) *Cell* 144 (5): 646-674).

Рецепторы Her1 и Her2 обладают схожей структурой, состоящей из внеклеточного домена (ECD), одиночного трансмембранного домена и внутриклеточного домена с тирозинкиназной активностью. Молекулярная масса ECD Her1 (ECD-Her1) и ECD Her2 (ECD-Her2) составляет 105 и 110 кДа соответственно, и они в отличие от остальной молекулы могут принимать разные конформации. ECD содержат четыре субдомена, обозначаемых I, II, III и IV. Субдомены I и III представляют собой области, формирующие участок связывания лиганда, и содержат потенциальные участки гликозилирования. Субдомен II является ключевой областью для димеризации рецепторов и его называют "плечом димеризации" (Garrett T.P. et al., (2002) *Cell.* 110 (6): 763-773; Ferguson K.M. et al., (2003) *Mol. Cell.* 11 (2): 507-517).

Всего описано семь лигандов Her1, среди которых наиболее значимыми для опухолеобразования являются эпидермальный фактор роста (EGF), стимулирующий пролиферацию клеток эпидермиса, экспрессирующий рецептор, трансформирующий фактор роста (TGF) и амфирегулин (Normanno et al., (2005) *Curr. Drug. Targets* 6 (3): 243-257). ECD-Her1 находится в динамическом равновесии и имеет несколько конформаций, которые включают "закрытые" конформации и конформации, в которых субдомен II находится в более подвижном состоянии. Связывание лиганда сдвигает равновесие в сторону "протяженной" или активной конформации, конформационному состоянию, которое способно к димеризации (Ferguson K.M., (2008) *Annu. Rev. Biophys.* 37: 353-373).

Однако специфического лиганда Her2 не выявлено. Передача сигнала через этот рецептор не требует факторов роста, так как рецептор в конститутивной форме имеет активную или "протяженную" кон-

формацию, экспонирующую его субдомен димеризации (Cho H.S. et al., (2003) *Nature* 421 (6924): 756-760). По этой причине рецептор Her2 является предпочтительным партнером димеризации для всех других представителей семейства ErbB, включая Her1 (Franklin M.C. et al., (2004) *Cancer Cell*. 5 (4): 317-328). Гетеродимеризация с Her2 способствует уменьшению степени эндоцитоза Her1 и увеличению возврата на мембрану рецепторов, формирующих гетеродимеры (Lenferink A.E. et al., (1998) *EMBO J.* 17 (12): 3385-3397).

Как описано Baselga J. et al., ((2009) *Nat. Rev. Cancer* 9 (7): 463-475), индуцированная лигандами димеризация обеспечивает аутофосфорилирование и трансфосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматической области рецепторов. Получаемые остатки фосфотирозина запускают несколько внутриклеточных сигнальных путей. Одним из иницируемых сигнальных путей является путь митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), в каскаде активации которых участвуют регулируемые внеклеточными сигналами протеинкиназы Erk1 и Erk2. Они индуцируют экспрессию факторов транскрипции, которые усиливают транскрипцию генов, вовлеченных в клеточную пролиферацию, таких как циклин D1, который стимулирует прохождение клеточного цикла до фазы G1/S. Комбинации гетеродимеров являются наиболее эффективными сигнальными комплексами и могут напрямую регулировать клеточный цикл (Pinkas-Kramarski R. et al., (1996) *EMBO J.* 15 (10): 2452-2467).

Эти опухолевые мишени тщательно проверены в клинических исследованиях. Проведена оценка клинического эффекта лечения ингибиторами тирозинкиназ (TKI) этих рецепторов, такими как гефитиниб и лапатиниб (Ciardiello F. et al., (2000) *Clin. Cancer Res.* 6 (5): 2053-2063; Kondo N. et al., (2010) *Oncol. Rep.* 23 (4): 957-963). Также существуют протоколы клинических испытаний с использованием моноклональных антител (MAb) к указанным выше мишеням, таких как цетуксимаб (Jean G.W. et al., (2008) *Pharmacotherapy* 8(6):742-54) и нимотузумаб (Ramos T.C., et al., (2006) *Cancer Biol. Ther.* 5 (4): 375-379), специфичных к ECD HER1, и трастузумаб, распознающего ECD Her2 (Clifford A., (2007) *N. Engl. J. Med.*; 357: 39-51). Несмотря на мощное противоопухолевое действие некоторых из этих терапевтических средств, таких как цетуксимаб, описаны молекулярные механизмы устойчивости, среди которых находятся повышенные уровни экспрессии другого рецептора этого семейства, например, Her2 (Brand T.M. et al., (2011) *Cancer Biol. Ther.* 11 (9): 777-792). С другой стороны, более хорошая реакция карцином молочной железы и легких, экспрессирующих гетеродимеры Her2, на пертузумаб, MAb мыши к Her1, выявлена с другими представителями семейства ErbB (Agus D.B. et al., (2005) *J. Clin. Oncol.* 23 (11): 2534-2543). Это поддерживает представление, что ингибирование гетеродимеризации является перспективной стратегией для терапии злокачественных опухолей.

Кроме того, в качестве новой терапевтической возможности появилась активная терапия вакциной против злокачественных опухолей, целью которой является активация реакции иммунной системы у пациентов с опухолями, экспрессирующими Her1 и Her2. Однако этот вид терапии является сложным, так как он включает стимуляцию иммунной системы, угнетенной супрессирующим действием опухоли, что делает необходимым использование в вакцинных составах адъюванты, помогающие получить эффективный ответ. К таким адъювантам относятся протеолипосомы очень малого размера (VSSP), получаемые из белков наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, которые способны активировать дендритные клетки (DC) и направить иммунный ответ по образцу ответа Т-хелперов первого типа (Th1), как описано в патенте WO 02/45746, зарегистрированном 6 декабря 2001 г.

Рецепторы Her1 и Her2 являлись мишенями различных кандидатов на роль вакцин, оцениваемых в доклинических и клинических исследованиях. При разработке вакцин на основе Her2 использовали вакцины DC (Czerniecki B.J. et al., (2007) *Cancer Res.* 67 (4): 1842-1852), пептиды Her2 и ECD Her2. (Ladjemi M.Z. et al., (2010) *Cancer Immunol. Immunother.* 59 (9): 1295-1312). В фазе II клинических испытаний у пациентов с раком молочной железы оценивали активную иммунизацию пептидом p369-377 (пептид E75), получаемым из ECD Her2 и презентуемым МНС-I, с использованием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в качестве адъюванта. Эта вакцина способна порождать *in vivo* цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), специфичные к клеткам, сверхэкспрессирующим Her2, и в настоящее время находится в фазе II клинических испытаний (Knutson K.L. et al., (2002) *Clin. Cancer Res.* 8 (5): 1014-1018; Patil R. et al., (2010) *J. Am. Coll. Surg.* 210 (2): 140-147). Кроме того, разработана терапевтическая вакцина на основе ECD Her2 с GM-CSF в качестве адъюванта, которая способна задержать рост карцином, экспрессирующих Her2, и продлевать продолжительность жизни иммунизированных животных (Helguera et al., (2006) *Vaccine* 16;24 (3):304-16).

В патентной заявке EP-A-661061 и патенте US-A-6149921 описаны вакцинные композиции, стимулирующие или усиливающие образование антител к ганглиозидам и содержащие иммуноген и иммунологический адъювант. Описанные иммуногены представляют собой VSSP, образованные посредством ассоциации N-ацетилированных GM3-ганглиозидов (N-AcGM3) и N-гликолил-GM3 (N-GcGM3) с белковым комплексом наружной мембраны (OMPC) бактерии *Neisseria meningitidis*. Иммуногены N-AcGM3/VSSP и N-GcGM3/VSSP имеют очень маленький размер, практически не видны под электронным микроскопом, растворимы в воде и имеют высокую плавучесть. В патенте WO-A-02145746 описаны вакцинные композиции, содержащие: (А) один или несколько слабоиммуногенных антигенов; (В) VSSP с включенными ганглиозидами, в основном N-AcGM3/VSSP и N-GcGM3/VSSP; и (С) необязательно

один или несколько адъювантов. В частности, описана вакцина, активным ингредиентом которой является ECD Her1, а в качестве адъювантов использованы VSSP и монтанид (Монтанид) ISA51 VG. Доклинические испытания этой вакцины продемонстрировали ее противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* (Ramirez B.S., et al., (2006) *Int. J. Cancer* 119 (9): 2190-2199; Ramirez B.S., et al. (2008) *Vaccine* 26 (38): 4918-4926).

Хотя результаты получены с моновалентными терапевтическими средствами, они не являлись достаточно эффективными, так как эти терапевтические средства не могут полностью удалить массу опухоли, и, даже когда размер опухоли уменьшается, в конечном итоге она рецидивирует после появления устойчивых вариантов. Это позволяет предполагать, что специфические нарушения не способны уничтожить такие сложные биологические системы, как опухоли. Это может объясняться тем, что в устойчивых вариантах, образуемых под действием монотерапевтических средств, мишенью которых являются представители семейства ErbB, увеличиваются уровни экспрессии других представителей семейства (Brand T.M., et al., (2011) *Cancer Biol. Ther.* 11 (9): 777-792), позволяя опухолям избегать атак иммунной системы. Вследствие этого, множественные нарушения биологии опухолей посредством инактивации нескольких рецепторов ErbB могли бы привести к повышению эффективности.

В патентной заявке WO-A-02145746 также заявлена композиция, содержащая рецепторы факторов роста Her1, Her2 и PDGF-R или любые их варианты, содержащие внеклеточный домен с трансмембранной областью или без нее. Однако ни в этой заявке, ни в каком-либо другом документе в данной области техники не объясняется, как комбинировать два рецептора, в частности ECD рецепторов Her1 и Her2 для производства бивалентной вакцины, эффективно индуцирующей продукцию антител у вакцинированного индивидуума.

Авторы настоящего изобретения выявили, что при смешении в равных пропорциях ECD Her1 и Her2 и VSSP-GM3 получают вакцинную композицию, способную индуцировать продукцию титров антител, которые ингибируют фосфорилирование Her1 и Her2, и эти антитела оказывают антипролиферативное действие на опухолевые клетки. Авторы изобретения также выявили, что пропорции, в которых комбинируют ECD Her1 и Her2, являются решающими для получения желаемого иммунного ответа, т.е. что не любая комбинация ECD рецепторов Her1 и Her2 инициирует этот иммунный ответ.

Целью настоящего изобретения являются новые вакцинные композиции с равными пропорциями ECD рецепторов Her1 и Her2 и VSSPS-GM3 для подкожного введения.

Дополнительной целью настоящего изобретения является способ лечения пациентов, страдающих заболеваниями, вызываемыми опухолями, экспрессирующими рецепторы факторов роста Her1 и Her2, включающий подкожное введение вакцинной композиции ECD рецепторов Her1 и Her2 и VSSPS-GM3, где ECD рецепторов Her1 и Her2 находятся в равных пропорциях.

Дополнительной целью настоящего изобретения являются вакцинные композиции с равными пропорциями ECD рецепторов Her1 и Her2 и VSSP-GM3 и с дополнительным адъювантом, который может быть масляным или не масляным.

Дополнительной целью настоящего изобретения является способ, посредством которого индуцируют иммунный ответ при лечении злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к вакцинной композиции, содержащей ECD рецепторов Her1 и Her2 или их фрагменты, используемые для индукции иммунного ответа против злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2. Эта вакцинная композиция дополнительно содержит протеолипосомы очень малого размера, очищенные из белков наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, и GM3 (VSSP-GM3). В конкретном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит фармацевтически подходящий адъювант. Эти фармацевтически подходящие адъюванты включают, но не ограничиваются, масляные адъюванты, такие как высокоочищенное минеральное масло и поверхностно-активное вещество, и немасляные адъюванты, например оксид алюминия.

Авторы настоящего изобретения неожиданно выявили, что пропорция, в которой комбинируются ECD рецепторов, значима для индукции иммунного ответа против злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2. Бивалентная вакцинная композиция, описываемая в настоящем документе, содержит ECD рецепторов Her1 и Her2 в равных пропорциях. Смесь обоих активных веществ, а именно ECD рецепторов Her1 и Her2, в других пропорциях не оказывает желаемого действия на иммунную систему. В одном из вариантов осуществления композиция по настоящему изобретению содержит ECD рецепторов Her1 и Her2 в диапазоне концентраций приблизительно от 100 до приблизительно 800 мкг/дозу. Более конкретно, композиция настоящего изобретения содержит 800 мкг/дозу каждого из ECD рецепторов Her1 и Her2 или их фрагментов и дополнительно содержит 1,2 мг/дозу VSSP-GM3, подкожно вводимых в водном растворе.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к вакцинной композиции, содержащей в равных пропорциях внеклеточные домены (ECD) рецепторов Her1 и Her2 в диапазоне концентраций от 100 до 800 мкг/дозу и протеолипосомы очень малого размера, полученные из белков наружной мембраны *Neisseria meningitidis* и ганглиозида GM3 (VSSP-GM3), для индукции иммунного ответа против зло-

качественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2.

В одном из вариантов осуществления указанная вакцинная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый адъювант, предпочтительно масляный адъювант или оксид алюминия.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к применению вакцинной композиции по изобретению для индукции иммунного ответа при лечении злокачественных опухолей, экспрессирующих Her1 и Her2.

В настоящем изобретении термины "бивалентный вакцинный состав" или "бивалентная вакцинная композиция" используют взаимозаменяемо, и во всех случаях они относятся к вакцинной композиции, содержащей внеклеточные домены (ECD) рецепторов Her1 и Her2 или их фрагменты, используемые для индукции иммунного ответа против злокачественных новообразований, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2, и которая может дополнительно содержать VSSP-GM3.

Настоящее изобретение относится также к способу лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2, согласно которому вводят подкожно вакцинную композицию по изобретению.

В одном из вариантов изобретения вакцинную композицию вводят подкожно каждые две недели в количестве всего 5 доз и затем ежемесячно вводят поддерживающую дозу по меньшей мере в течение одного года.

Злокачественные опухоли, которые можно лечить этой вакцинной композицией, включают опухоли, экспрессирующие по меньшей мере один рецептор семейства Her, в частности Her1 и/или Her2. Предпочтительно опухоли экспрессируют оба рецептора, а более предпочтительно опухоли сверхэкспрессируют оба рецептора. В предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение относится к опухолям эпидермального происхождения, а более конкретно к опухолям головы, шеи, молочной железы, легких, толстого кишечника, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря и яичников и к глиоме. Аббревиатуры MAb и PAb относятся к моноклональным и поликлональным антителам соответственно.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена кинетика Ab IgG у мышей BALB/c ($n=5$), подкожно иммунизированных четыре раза каждые 14 суток и через 30 суток после последней иммунизации 100 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2 в 200 мкг VSSP. Забор крови производили на 7, 21, 35, 56, 87 и 102 сутки для измерения титров Ab IgG в иммунных сыворотках с использованием анализа ELISA. Кинетика Ab IgG выражена в виде логарифма ($1/\text{среда для титрования}+1$) для каждых суток выделения после обработки ECD-Her1 (a) и ECD-Her2 (b). На чертеже представлен ответ Ab отдельных мышей ($n=5$), ответ специфичен для ECD-Her1 (c) и ECD-Her2 (d) и его измеряли посредством построения графика логарифма обратной величины титра Ab плюс 1 на 87 сутки протокола иммунизации. Различные буквы означают статистическую значимость, проанализированную посредством двустороннего ANOVA (где фактором является группа лечения) с использованием поправки Бонферрони ($p<0,05$).

На фиг. 2 представлено распознавание линий опухолевых клеток MDAMB468 и MCF7/HER2 иммунными сыворотками, индуцированными бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентными вакцинами Her1 и Her2 с использованием проточной цитометрии. Указанные выше линии опухолевых клеток человека инкубировали с иммунными сыворотками ($n=5$) или со смесью преиммунных сывороток, разведенных 1:200 на 35 сутки протокола иммунизации, а также с контролями экспрессии рецепторов: MAb нимотузумабом и трастузумабом в концентрациях 10 мкг/мл. Затем клетки метили PAb козы к IgG мыши, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом. Меченые клетки визуализировали посредством проточной цитометрии. Процент клеток, распознаваемых сыворотками и MAb, определяли с использованием программного обеспечения Flow Jo версии 5.7.2. Различные буквы означают статистическую значимость, проанализированную посредством двустороннего ANOVA (где фактором является группа лечения) с использованием поправки Бонферрони ($p<0,05$).

На фиг. 3 представлено распознавание опухолевых клеток линии H292 иммунными сыворотками, индуцированными бивалентной вакциной Her1+Her2, и моновалентными вакцинами Her1 и Her2 с использованием проточной цитометрии. Опухолевые клетки человека на 35 сутки протокола иммунизации инкубировали с иммунными сыворотками ($n=5$) или смесью преиммунных сывороток, разведенных 1:300, а также с контролями экспрессии рецепторов: MAb нимотузумабом и трастузумабом в концентрациях 10 мкг/мл. Затем клетки метили PAb козы к IgG мыши, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом. Меченые клетки визуализировали посредством проточной цитометрии. Процент клеток, распознаваемых сыворотками и MAb, определяли с использованием программного обеспечения Flow Jo версии 5.7.2. Различные буквы обозначают статистическую значимость, проанализированную посредством двустороннего ANOVA (где фактором является группа лечения) с использованием поправки Бонферрони ($p<0,05$).

На фиг. 4 представлено ингибирование фосфорилирования Her1 и Her2, вызываемое иммунной сывороткой, индуцированной введением бивалентной вакцины Her1+Her2. Клетки H292 инкубировали в смеси пяти иммунных сывороток, индуцированных бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентными вакцинами Her1 и Her2. Уровни фосфорилирования Her1 и Her2 после стимуляции EGF и различной об-

работкой определяли посредством вестерн-блоттинга. В качестве отрицательного контроля использовали необработанные клетки, а в качестве отрицательного контроля специфичности использовали клетки, обработанные смесью преиммунных сывороток (PI). В качестве положительного контроля ингибирования использовали TKI AG1478. На чертежах представлены уровни P-Her1 (a) и P-Her2 (b), получаемые при различной обработке. На гистограммах представлен денситометрический анализ изображений после одного из характерных экспериментов, выбранного из двух проведенных экспериментов.

На фиг. 5 представлено антипролиферативное действие Ab, индуцированных бивалентной вакциной Her1+Her2 на опухолевую линию H292. На 87 сутки протокола иммунизации клетки H292 инкубировали 48 ч в смеси пяти иммунных сывороток, разведенных 1:20. В качестве отрицательного контроля в эксперименте использовали смесь PI сывороток. Жизнеспособность клеток определялась колориметрическим способом MTT, определяя разницу оптической плотности (OD), вычитая OD при 540 нм из значения OD при 620 нм. Максимальный процент жизнеспособности выявлен при вычитании различий в поглощении при инкубации с PI сывороткой. Столбцы представляют среднее трех экспериментов для каждого вида обработки. Различные буквы обозначают статистическую значимость по T3 тесту Даннета для a в зависимости от b, $p < 0,01$, а в зависимости от c $p < 0,001$.

На фиг. 6 представлены титры Ab, распознающих ECD-Her1 и ECD-Her2, индуцированные бивалентными вакцинными составами Her1+Her2, содержащими равное или неравное количество каждого рецептора. Мышей BALB/c ($n=5$) подкожно иммунизировали четыре раза каждые 14 суток с использованием для группы 1 100 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2; для группы 2 100 мкг ECD-Her1 и 200 мкг ECD-Her2; для группы 3 100 мкг ECD-Her1 и 300 мкг ECD-Her2; для группы 4 200 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2; для группы 5 300 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2. Все составы содержали 200 мкг VSSP. Определение титров специфических антител ECD-Her1 и ECD-Her2 проводили в сыворотках после забора крови, проводимого на сутки 56, посредством анализа ELISA. Кинетика Ab IgG выражена в виде среднего логарифма обратной величины плюс один для каждых суток выделения после обработки ECD-Her1 (a) и ECD-Her2 (b). Ответ на Ab IgG отдельных мышей ($n=5$) определяли посредством построения графика обратных величин титров антител.

Статистически значимых различий при тесте посредством двустороннего ANOVA (где фактором является группа лечения) с использованием поправки Бонферрони ($p < 0,05$) не наблюдали. Приводимые ниже примеры предназначены только для иллюстрации заявляемого изобретения, но никаким образом не для его ограничения.

Примеры

Пример 1. Титры специфических антител, индуцированных против ECD-Her1 и DEC-Her2, индуцированных бивалентной вакциной Her1+Her2.

Мышей Balb/c подкожно иммунизировали бивалентным вакцинным составом, содержащим 100 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2. Вторую группу мышей прививали моновалентным вакцинным составом, содержащим 100 мкг ECD-Her1, а третью группу прививали моновалентным вакцинным составом, содержащим 100 мкг ECD-Her2. В трех указанных выше вакцинных составах также содержалось по 200 мкг адьюванта VSSP. Иммунизации проводили на сутки 0, 14, 28, 42 и 72, а забор крови производился на сутки 2, 21, 56, 87 и 102. В сыворотке определяли титры специфических антител к ECD Her1 и Her2 способом ELISA.

У мышей, иммунизированных бивалентной вакциной Her1+Her2, происходила индукция специфических антитела изотипа IgG к ECD-Her1 и ECD-Her2. Титры антител, индуцированных к каждому из этих рецепторов, не отличали от титров, индуцированных соответствующими моновалентными вакцинами. В случае ответа антителами против ECD-Her1 титры, индуцированные бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентной вакциной, достигли значений 1/10000. Ответ против ECD-Her2, индуцированный бивалентной и моновалентной вакцинами, достигал значений титров антител 1/200000 (фиг. 1).

Этот результат демонстрирует, что смешивание двух рецепторов в одном вакцинном составе не влияет на иммуногенность каждого из них по отдельности, что обосновывает потенциальное использование этого вакцинного состава.

Пример 2. Распознавание опухолевых линий Her1⁺/Her2⁻, Her1⁻/Her2⁺ сыворотками, индуцированными бивалентной вакциной Her1+Her2.

Сыворотки, полученные у мышей, иммунизированных бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентными вакцинами Her1 и Her2, разбавленные в соотношении 1/200, инкубировали с 10^5 клеток различных линий опухолевых клеток: MDA-MB468 (ATCC, НТВ-132), полученной из аденокарциномы молочной железы и MCF7/Her2, полученной при трансфекции линии клеток MCF7 (ATCC НТВ-22) полно-размерным Her2 в качестве отрицательного контроля специфичности использовали PI сыворотки. В качестве положительного контроля использовали Mab нимотузумаб, распознающее Her1, и моноклональное антитело герцептин, распознающее Her2.

Сыворотки, полученные посредством бивалентной вакцины, распознавали такой же процент клеток MDA-MB468, что и сыворотки, полученные посредством моновалентной вакцины Her1. Кроме того, в соответствии с тестом Даннета T3 ($p > 0,05$), сыворотки, полученные посредством бивалентной вакцины, распознавали такой же процент клеток MCF7/Her2, что и сыворотки, полученные посредством моно-

лентной вакцины Her2 (фиг. 2). Интенсивность распознавания этих рецепторов также была очень сходной (табл. 1). Это демонстрирует, что антитела, индуцированные бивалентным составом, содержащим укороченные рецепторы Her1 и Her2, не влияют на узнавание полноразмерных рецепторов Her1 и Her2 в мембранах опухолевых клеток. Также она демонстрирует, что на качество распознавания не влияет, если антитела к Her1 и Her2 получают из состава на основе обоих рецепторов, так как распознавание было таким же, как распознавание, получаемое с использованием сывороток после моновалентных вакцин, как по числу распознанных клеток, так и по интенсивности распознавания.

Таблица 1

Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) клеток MDAMB468 и MCF7/HER2, распознаваемых иммунными сыворотками, получаемыми при обработке		
Обработка	MDAMB 468	MCF7/Her2
	MFI	MFI
Вак Her1+Her2	440,05	140,99
Вак Her1	370,23	4,31
Вак Her2	4,02	104,05

Пример 3. Распознавание опухолевой линии Her1⁺/Her2⁺ сыворотками, индуцированными бивалентной вакциной Her1+Her2.

Сыворотки, полученные у мышей, иммунизированных бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентными вакцинами Her1 и Her2, разбавленные 1/300, инкубировали с опухолевыми клетками линии H292 (ATCC CRL-1848), полученной из плоскоклеточного рака легких. В качестве отрицательного контроля специфичности использовали преиммунные сыворотки. В качестве положительного контроля использовали МАb нимотузмаб и МАb герцептин. В соответствии с тестом Даннета Т3 ($p < 0,05$), процент распознаваемых клеток H292 в сыворотке, получаемой посредством бивалентной вакциной, по сравнению с процентом в сыворотке, получаемой посредством моновалентных вакцин Her1 и Her2, был статистически выше (фиг. 3).

Это демонстрирует, что поликлональные антитела, индуцированные бивалентным составом, имеют более высокий порог распознавания опухолевых клеток вследствие их способности одновременно распознавать оба рецептора Her1 и Her2 на мембранах клеток. Это свидетельствует о том, что в отношении биологического действия на опухолевые клетки H292, измеряемого по количеству распознанных рецепторов, бивалентная вакцина имеет более высокий потенциал по сравнению с моновалентными вакцинами. Это происходит в случае ингибирования активации рецепторов из семейства Her, вовлеченных в пролиферацию опухолей.

Пример 4. Ингибирование активации рецепторов HER1 и HER2 бивалентной вакциной Her1+Her2.

Сыворотки, получаемые у мышей, иммунизированных бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентными вакцинами Her1 и Her2, разведенные 1/100, инкубировали с клетками линии опухолевых клеток H292. Клетки стимулировали 100 нг/мл EGF в течение 10 мин, а затем лизировали. Действие иммунных сывороток на ингибирование фосфорилирования EGFR определяли посредством анализа вестерн-блоттинга с использованием специфических антител для детекции фосфорилированного EGFR и общего EGFR. В данном анализе в качестве положительного контроля ингибирования фосфорилирования использовали 10 мкМ ингибитора тирозинкиназы AG1478, а в качестве отрицательного контроля специфичности использовали PI сыворотку.

Сыворотки, получаемые посредством бивалентной вакцины, ингибировали активацию рецепторов Her1 и Her2, измеряемую в показателях фосфорилирования, в большей степени, чем сыворотки, получаемые посредством моновалентных вакцин Her1 и Her2. Снимки с результатами вестерн-блоттинга подвергали денситометрическому анализу. Полученные данные денситометрического анализа демонстрируют, что фосфорилирования Her1, обусловленное иммунными сыворотками, индуцированными бивалентной вакциной Her1+Her2, по отношению к PI сыворотке снизилось в 11,2 раз. Когда этот же анализ проводили для сывороток, индуцированных моновалентной вакциной Her, фосфорилирование Her1 снизилось в 1,7 раза. В случае сывороток из группы моновалентной вакцины Her2 снижение происходило в 2,2 раза. В случае Her2 фосфорилирование Her2, индуцированное сыворотками, полученными у мышей, иммунизированных бивалентной вакциной Her1+Her2, по сравнению с PI сывороткой снизилось в 8,7 раза. Когда этот анализ проводили для сывороток, индуцированных моновалентной вакциной Her1, фосфорилирование Her2 снижалось в 1,7 раза, а для сывороток из группы моновалентной вакцины Her2 снижение происходило в 3,5 раза (фиг. 4).

Это демонстрирует преимущество бивалентной вакцины относительно моновалентных вакцин. Бивалентная вакцина была не только способна непосредственно ингибировать фосфорилирование рецепторов Her1 или Her2, образующих гомодимеры (Her1/Her1 и Her2/Her2) посредством антител, блокирующих связывание лиганда к плечу димеризации, но она также может быть более эффективной, чем моновалентные вакцины, в отношении снижения активации рецепторов, которые являются частью гетероди-

мера Her1/Her2.

Пример 5. Антипролиферативное действие сывороток, индуцированных бивалентной вакциной Her1+Her2, на линии опухолевых клеток Her1⁺/Her2⁺.

H292 в течение 48 ч инкубировали с сывороткой, полученной у мышей, иммунизированных бивалентной вакциной Her1+Her2 и моновалентными вакцинами Her1 и Her2, разбавленными 1:20. После этого супернатант культуры удаляли и добавляли реагент МТТ в концентрации 1 мг/мл. Через 4 ч инкубации супернатант удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида для растворения формазановых кристаллов; поглощение измеряли, определяя разницу OD посредством вычитания OD при 540 нм из значения OD при 620 нм с использованием сканера ELISA. Жизнеспособность клеток оценивали, определяя разницу поглощения при 540 нм и 620 нм. Разницу поглощения, получаемую в PI сыворотке, принимали за максимальный процент жизнеспособности.

В соответствии со статистическим тестом Даннетта Т3 ($p < 0,05$) опухолевые клетки, обрабатываемые сыворотками, индуцированными бивалентной вакциной Her1+Her2, имели более низкую жизнеспособность, чем опухолевые клетки, инкубируемые с сыворотками, индуцированными моновалентными вакцинами (фиг. 5). Это демонстрирует, что введение бивалентной вакцины индуцировало большее противоопухолевое действие на клетки в отношении антипролиферативных свойств, чем моновалентные вакцины. Это свидетельствует о ее потенциале быть эффективным терапевтическим средством против эпителиальных опухолей, экспрессирующих оба рецептора.

Пример 6. Неравные дозы ECD-Her1 и ECD-Her2 снижают количество антител, получаемых для распознавания H125/Her1⁺/Her2⁺.

Мышей Balb/c подкожно иммунизировали бивалентным вакцинным составом, содержащим неравные комбинации ECD-Her1 и ECD-Her2. Группу 1 прививали 100 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her1; группу 2 100 мкг ECD-Her1 и 200 мкг ECD-Her2; группу 3 100 мкг ECD-Her1 и 300 мкг ECD-Her2; группу 4 200 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2; группу 5 300 мкг ECD-Her1 и 100 мкг ECD-Her2. Все указанные вакцинные составы с адъювантом содержали 200 мкг VSSP. Иммунизацию проводили на сутки 0, 14 и 28 посредством подкожных инъекций, а забор крови для получения сыворотки проводили на сутки 42. Титры антител специфичных к ECD Her1 и Her2 определяли с использованием ELISA, а способность вышеуказанных сывороток распознавать линию опухолевых клеток H125, экспрессирующих Her1 и Her2, оценивали посредством FACS (фиг. 6).

Процент опухолевых клеток, распознаваемых иммунными сыворотками, составлял 100% для всех исследованных групп, что объяснялось способностью наблюдаемых вариантов составов индуцировать титры антител к Her1 и Her2. Однако качество распознавания, измеряемое по показателю средней интенсивности флуоресценции (MFI), было выше для группы 1, где комбинировали равные дозы обоих рецепторов (табл. 2).

Таблица 2

Распознавание линии опухолевых клеток H125 иммунными сыворотками, индуцированными бивалентными вакцинами Her1+Her2, содержащими равные и неравные дозы каждого рецептора				
Группы	G1	G2	G3	G4
ECD-Her1 (мкг)	100	100	100	200
ECD-Her2 (мкг)	100	200	300	100
Распознаваемые клетки (%)	100	100	100	100
MFI	90,86	71,3	45,7	60,6

MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция, содержащая в равных пропорциях внеклеточные домены (ECD) рецепторов Her1 и Her2 в диапазоне концентраций от 100 до 800 мкг/дозу и протеолипосомы очень малого размера, полученные из белков наружной мембраны *Neisseria meningitidis* и ганглиозида GM3 (VSSP-GM3), для индукции иммунного ответа против злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2.

2. Вакцинная композиция по п.1, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый адъювант.

3. Вакцинная композиция по п.2, в которой фармацевтически приемлемый адъювант представляет собой масляный адъювант.

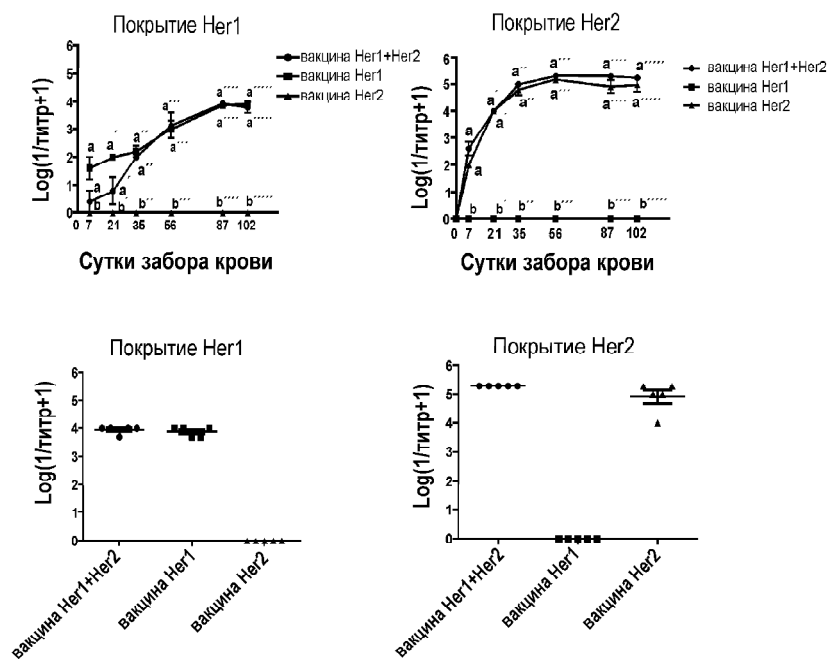
4. Вакцинная композиция по п.2, в которой фармацевтически приемлемый адъювант представляет собой оксид алюминия.

5. Применение вакцинной композиции по любому из пп.1-4 для индукции иммунного ответа при

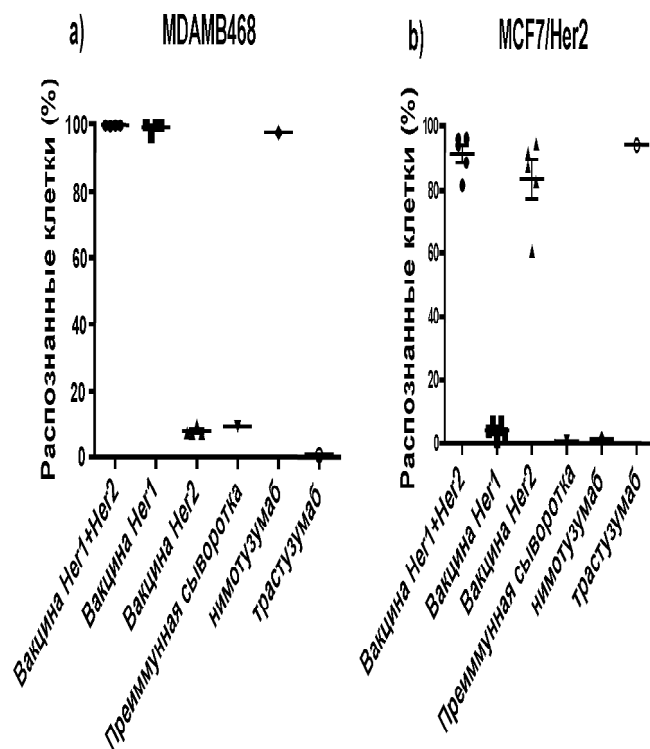
лечении злокачественных опухолей, экспрессирующих Her1 и Her2.

6. Способ лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих рецепторы Her1 и Her2, согласно которому вводят подкожно вакцинную композицию по любому из пп.1-4.

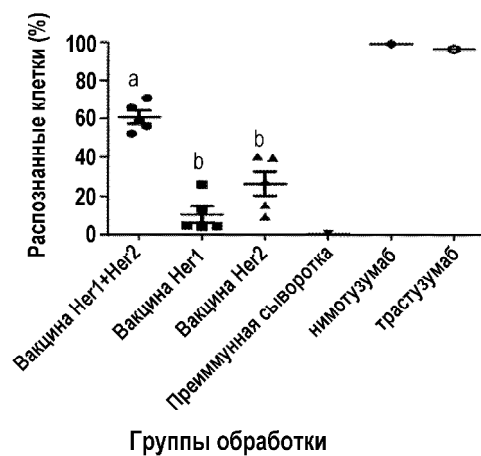
7. Способ по п.6, в котором вакцинную композицию вводят подкожно каждые две недели в количестве всего 5 доз и затем ежемесячно вводят поддерживающую дозу по меньшей мере в течение одного года.



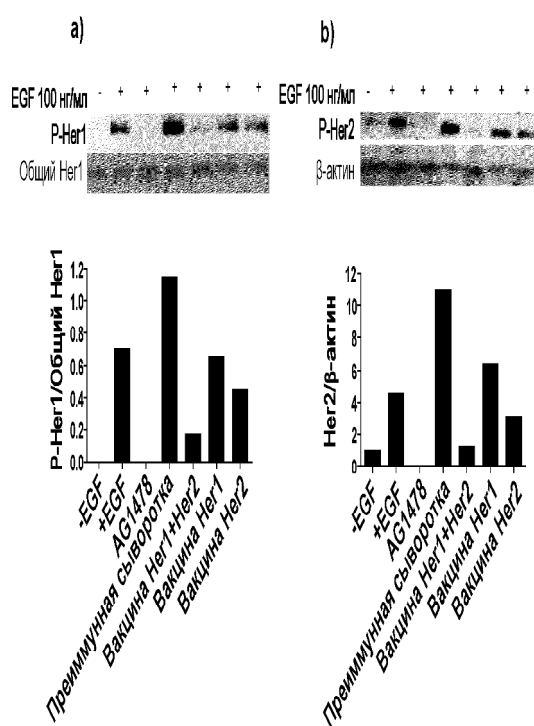
Фиг. 1



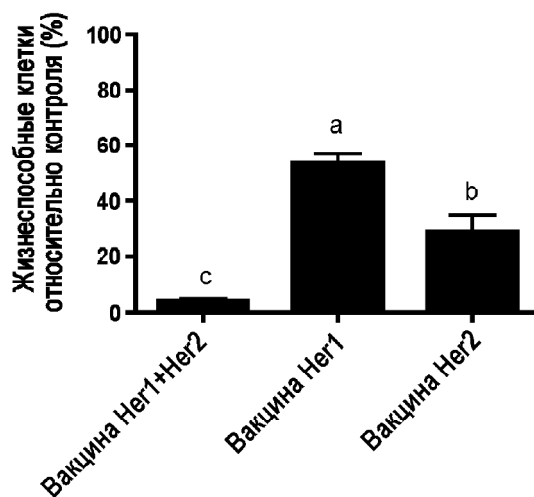
Фиг. 2



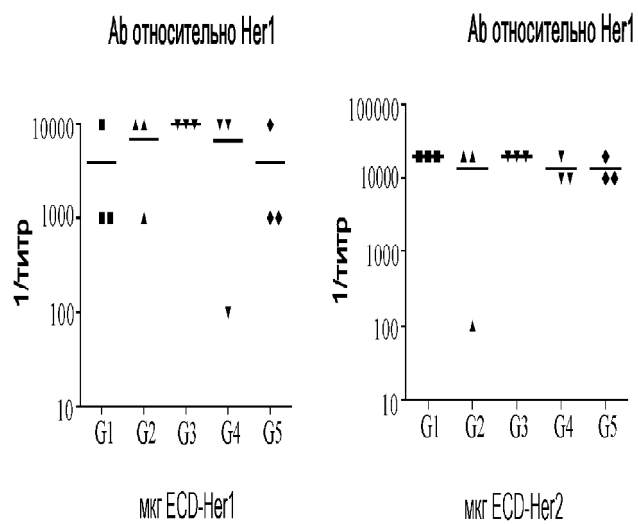
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



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