



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.09

(21) Номер заявки
201891115

(22) Дата подачи заявки
2016.11.17

(51) Int. Cl. **A61K 9/08** (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НОВАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЧАСТИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КОМПЛЕКС ДВУХНИТЕВОГО ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДА И ПОЛИАЛКИЛЕНИМИНА

(31) **15194864.3**

(32) **2015.11.17**

(33) **EP**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/EP2016/078078**

(87) **WO 2017/085228 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ХАЙЛАЙТ ТЕРАПЬЮТИКС, С.Л.
(ES)**

(72) Изобретатель:
**Посуело Рубио Мерседес, Кинтеро
Ортис Марисоль, Вильянуэва Гарсия
Ана (ES)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) DAVID SCHAFFERT ET AL.: "Poly(I:C)-Mediated Tumor Growth Suppression in EGF-Receptor Overexpressing Tumors Using EGF-Polyethylene Glycol-Linear Polyethylenimine as Carrier", PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 28, no. 4, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 731-741, XP055236351, US ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1007/s11095-010-0225-4 abstract, page 732, right-hand column, last paragraph - page 733, right-hand column, paragraph 4 page 734, left-hand column, last paragraph - page 734, right-hand column, paragraph 1 page 735; table 1 page 737, right-hand column, paragraph 3 - page 739, left-hand column, paragraph 1 page 740, left-hand column, paragraph 2

KUROSAKI T. ET AL.: "Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 30, no. 14, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 2846-2853, XP025970952, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.01.055 [retrieved on 2009-02-20] page 2846, left-hand column, paragraph 1 page 2847, left-hand column, paragraphs 2, 3 page 2847; figure 1; table 1

WO-A1-2013087083

WO-A1-2011003883

WO-A1-2015173824

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим частицы, при этом каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида, такого как полиинозиновая-полицитидиловая кислота [poly(I:C)], и по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина. Частицы также характеризуются своим мономодальным распределением по диаметру и z-средним диаметром в конкретных диапазонах. Изобретение дополнительно относится к применению указанных композиций в качестве лекарственных препаратов, в частности, для лечения нарушения клеточного роста, характеризующегося аномальным ростом клеток человека или животного, а также к способам получения указанных композиций.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических составов, содержащих частицы, образованные из полирибонуклеотидов и полимеров, их получению и их медицинскому применению.

Предпосылки изобретения

В последние годы изучали применение синтетических аналогов двухнитевой РНК (dsRNA), которые имитируют вирусную dsRNA, в отношении специфичной активации иммунной системы против опухолей с целью ингибирования роста раковых клеток и индуцирования апоптоза раковых клеток. В частности, двухнитевая полиинозиновая-полицитидиловая кислота (называемая poly(I:C) или pIC) была охарактеризована как тип dsRNA с различными эффектами, представляющими терапевтический интерес, против различных видов рака (таких как меланома, гепатома, рак прямой кишки, желудка и ротовой полости, рак шейки матки, рак молочной железы, рак яичников, опухоли мочевыводящих путей, рак легкого и предстательной железы) и их метастазирования посредством механизмов, которые могут быть зависимыми или независимыми от активации иммунной системы, видов активности, опосредованных естественными киллерами и/или дендритными клетками, и/или изменений экспрессии и микроокружения опухолевых генов (Hafner A. et al., 2013).

К сожалению, эти исходные клинические данные подтвердились в малой степени или вовсе не подтвердились в клинических исследованиях с "голыми" молекулами poly(I:C), которые проявляли свою низкую стабильность, слабую гомогенность, непредсказуемую фармакокинетику и ограниченные противоопухолевые эффекты по причине нескольких механизмов, таких как слабое клеточное поглощение или разрушение цитозольными РНКазми (Hafner A. et al., 2013). В действительности, для достижения эффективного терапевтического или профилактического эффекта может потребоваться повторное растворение молекул poly(I:C) непосредственно перед применением или незадолго до этого, молекулы могут быть доступны в составах при низких концентрациях и/или потребуются их частое введение (например, каждые 2 ч).

На протяжении последних нескольких лет был достигнут значительный прогресс в составлении молекул poly(I:C) с иммуномодулирующими и/или терапевтическими свойствами. Были раскрыты различные способы получения и составления молекул poly(I:C) в виде порошка и/или интегрированными в микрочастицы на основе полимера вместе с нацеливающими фрагментами и дополнительными химическими линкерами или без них (CN 103599071; CN 102988303; WO 2004045491; WO 2008057696; WO 2013164380; WO 2015067632, WO 2014057432; WO 2014165296; Schaffert D. et al., 2011; WO 2015173824, Kabilova T. et al., 2014; Kübler K. et al., 2011; Palchetti S. et al., 2013; Saheki A. et al., 2011). Молекулы poly(I:C) были составлены с полимерами-носителями и в форматах, совместимых с назальным введением (WO 2013164380), стабилизированы с помощью полилизина и карбоксиметилцеллюлозы (WO 2005102278), инкапсулированы в катионных покрытых липидами наночастицах на основе фосфата кальция, липосомах или других везикулярных структурах (Chen L. et al., 2013; US 2009117306; US 2011003883, или совместно с одонитевой РНК и с катионными пептидами, подобными протамину (WO 2013087083)). В качестве альтернативы молекулы poly(I:C) также иммобилизовали на твердых частицах и носителях, таких как наночастицы на основе оксида железа, вместе со средствами или без средств, которые бы способствовали нацеливанию молекул poly(I:C) на конкретные клетки или ткани (McBain S. et al., 2007; Cobaleda-Siles M. et al., 2014).

В некоторых публикациях дополнительно раскрыты различные тройные или четвертичные комплексы в субмикронном диапазоне, которые образованы из полимеров, poly(I:C) и/или двухнитевой ДНК, вместе с другими компонентами или без них и являются ген-специфичными (Kurosaki T. et al., 2009.; WO 2013040552; WO 2013063019; Tutin-Moeavin I. et al., 2015). Однако целью данных подходов является обеспечение средств, которые по сути вводят ДНК в клетки, при этом сохраняя их жизнеспособность и не уничтожая селективно раковые клетки.

Трудности, которые ограничивают разработку молекул poly(I:C) в качестве лекарственного средства и его соответствие регуляторным требованиям, можно преодолеть путем получения структурно сложных противораковых комплексов, содержащих молекулы poly(I:C) вместе с системами доставки лекарственных средств для терапии рака, которые часто основаны на катионных полимерах, таких как хитозан, полиэтиленмин (PEI), поли-L-лизин, полиметакрилаты, имидазол- или циклодекстринсодержащие полимеры, поли(β-аминоэфиры) и родственные дендримеры. Данные полимерные системы (также называемые Polyplex) структурно и функционально отличаются от систем на основе липидов (также называемых Lipoplex) и гибридных систем (также называемых Lipopolyplex), которые сходным образом применяются для местной или системной доставки нуклеиновых кислот (Bilensoy E., 2010; Germershaus O. и Nultsch K., 2015). Среди Polyplex PEI является представляющим особый интерес катионным полимером, который может быть модифицирован на уровне линейной/разветвленной структуры и размера, химической связи, способности к разрушению и получения производных (Islam M. et al., 2014) и который, в отличие от интернализации lipoplex клетками, интернализуется как за счет опосредованного клатрином, так и за счет опосредованного кавеолами эндоцитозом (Shabani M. et al., 2010).

Данный терапевтический подход, включающий получение и введение молекул poly(I:C), связанных с PEI, проиллюстрирован на примере в литературе с помощью средства, называемого BO-110 (Pozuelo-

Rubio M. et al., 2014; Tormo D. et al., 2009; WO 2011003883). Данный комплекс, также определяемый как $[pIC]^{PEI}$, не только вызывает двойное индуцирование аутофагии и апоптоза в нескольких линиях раковых клеток меланомы и других типов опухолей (таких как глиомы или карциномы), но также не оказывает влияния или оказывает ограниченное влияние на жизнеспособность нормальных клеток, таких как меланоциты. BO-110 ингибирует рост меланомы в животных моделях с демонстрацией противоопухолевой и противометастатической активности *in vivo* даже у мышей с тяжелой иммунной недостаточностью. Кроме этого, сходное средство на основе $[pIC]^{PEI}$ стимулирует апоптоз в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, не оказывая влияния на нормальные эпителиальные клетки поджелудочной железы, и введение *in vivo* $[pIC]^{PEI}$ ингибировало опухолевый рост в животных моделях опухолей (Bhoopathi P. et al., 2014). Дополнительный эффект введения BO-110 охарактеризован с помощью модели эндометриоза, где такое средство уменьшает ангиогенез и клеточную пролиферацию и увеличивает апоптоз (García-Pascual C. и Gomez R., 2013).

Таким образом, BO-110 и сходные средства $[pIC]^{PEI}$, которые содержат двухнитевые полирибонуклеотиды, представляют собой новую противораковую стратегию с широким спектром действия благодаря объединенной активации аутофагии и апоптоза, при этом автономно и селективно в опухолевых клетках при поддержании жизнеспособности нормальных клеток различных клеточных линий. Тем не менее, в отношении BO-110, как и для других средств на основе двухнитевых полирибонуклеотидов, которые продемонстрировали эффективность в различных доклинических моделях, будучи связанными с носителями, по-прежнему необходимо предоставление в составах, которые стабильны при разных условиях хранения, обеспечение однородности при получении и доведение до заданного размера.

В действительности, предыдущий уровень техники не обеспечивает подходящего руководства для решения вопросов, связанных с наиболее эффективным сочетанием структурных и биофизических критериев, которые позволяют получать poly(I:C)-содержащие композиции для лечения рака. Регулирующие органы также требуют строгого соответствия инструкциям в отношении воспроизводимости, хранения и однородности размера и концентрации poly(I:C)-содержащих частиц, которые включены в композиции для применения у людей. Таким образом, средства, композиции и связанные с ними способы, обеспечивающие молекулы двухнитевых полирибонуклеотидов, такие как молекулы poly(I:C), при более высоких и хорошо контролируемых концентрациях по-прежнему нуждаются в обеспечении их экстенсивной доклинической и клинической разработке в качестве лекарственного средства (в частности, против рака), при улучшении соблюдения пациентом схемы лечения и уменьшения частоты дозирования молекул двухнитевых полирибонуклеотидов с четко определенными уровнем безопасности и терапевтическими эффектами.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата;

(ii) по меньшей мере 95% или по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм, предпочтительно менее или равным 300 нм (например, от 140 до 250 нм); и

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 200 нм, предпочтительно менее или равным 150 нм, в частности, измеренным согласно ISO 22412.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к водной композиции, содержащей частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиную-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], и средняя молекулярная масса указанного линейного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа;

(ii) по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 300 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 150 нм, измеренным согласно ISO 22412; и

(iv) указанная композиция характеризуется дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, согласно ISO 13099.

Настоящее изобретение также относится к водной композиции, содержащей частицы, раскрытые в настоящем документе, где

(i) каждая из указанных частиц образована путем получения комплекса по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиную-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], и средняя молекулярная масса указанного линейного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа;

(ii) по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются мономодальным диаметром менее 300 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 150 нм, измеренным согласно ISO 22412; и

(iv) указанная композиция характеризуется дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, согласно ISO 13099;

где указанные частицы образованы при соотношении количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида в указанной композиции, равном или составляющем более 2,5.

Настоящее изобретение также относится к композиции, получаемой путем лиофилизации водной композиции, раскрытой в настоящем документе.

Дополнительно настоящее изобретение относится к композиции, раскрытой в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, раскрытой в настоящем документе, для применения в лечении нарушения клеточного роста, характеризующегося аномальным ростом клеток человека или животного.

Более того, настоящее изобретение относится к способу получения композиции, раскрытой в настоящем документе, который включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;

(ii) фильтрование независимо каждого раствора через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 500 нм, с образованием стерилизованных растворов;

(iii) смешивание полученных стерилизованных растворов в смесительной камере с образованием водной композиции путем добавления одного из указанных растворов в другой раствор в указанной смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин, или путем одновременного добавления каждого из указанных растворов в указанную смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин; и необязательно

(iv) фильтрование полученной водной композиции через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 600 нм, с образованием фильтрата или центрифугирование полученной водной композиции при ускорении, составляющем более или равном 22480 м/с^2 , с образованием надосадочной жидкости; и/или

(v) лиофилизацию полученных водной композиции, фильтрата или надосадочной жидкости.

Предпочтительно настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где

(a) указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)] или полиадениловую-полиуридиловую кислоту [poly(A:U)], где по меньшей мере 60% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 5000 пар оснований и от 20 до 45% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 850 пар оснований; и

(b) указанный полиалкиленимин содержит по меньшей мере 95% полиэтилениминов, где средневесовая молекулярная масса указанного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа, и коэффициент полидисперсности составляет $<1,5$, и при этом соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида в указанной композиции составляет от 2,5 до 5,5;

(ii) по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм; и

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим от 30 до 150 нм.

Более предпочтительно настоящее изобретение также относится к водной композиции, которая содержит частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где

(a) указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], где по меньшей мере 60% указанной poly(I:C) имеет по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанной poly(I:C) имеет от 400 до 5000 пар оснований и от 20 до 45% указанной poly(I:C) имеет от 400 до 850 пар оснований; и

(b) указанный полиалкиленимин представляет собой полиэтиленимин (PEI), где средневесовая молекулярная масса указанного PEI составляет от 17,5 до 22,6 кДа, и коэффициент полидисперсности составляет $<1,5$, и при этом соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитенового полирибонуклеотида в указанной композиции составляет от 2,5 до 4,5;

(ii) по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 500 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим от 60 до 130 нм; и

(iv) указанные частицы характеризуются медианным диаметром ($D_{50\%}$), составляющим от 75 до 150 нм.

Дополнительные варианты осуществления, которые относятся к получению таких композиций в форме составов на основе ВО-11X, их характеристикам, их анализу и к их применениям, предоставлены в подробном описании и примерах ниже по тексту.

Описание графических материалов

Фиг. 1 - определение функциональной активности отдельных препаратов ВО-111 после фильтрования или центрифугирования путем анализа клеточной гибели в клетках меланомы SK-Mel-103 после 48-часового воздействия. (A) Молекулы poly(I:C) связываются с PEI с образованием комплексов ВО-111 в соответствии с описанием производственной обработки с 2 флаконами в примере 1, и полученный раствор либо фильтруют с использованием мембраны с разными размерами пор (и затем используют профильтрованный раствор для клеточных анализов), либо центрифугируют при разных скоростях (и затем используют надосадочную жидкость для клеточных анализов), получая отдельные препараты ВО-111, каждый из которых содержит комплексы на основе poly(I:C) с более гомогенным, меньшим размером, который определяли как z-средний диаметр (гидродинамический диаметр, выраженный как d , нм). Количественно сходные данные получены с помощью исследования клеточной гибели через 24 ч. Данные по клеточной гибели сравнили с образцом, не обработанным с помощью ВО-111. (B) Дозозависимая активность препарата ВО-111, который получен посредством фильтрования через фильтр 0,8 мкм (заштрихованные столбцы), при сравнении с соответствующим нефильтрованным препаратом ВО-111 (белые столбцы). Поскольку центрифугирование или фильтрование приводит к некоторой потере poly(I:C) по причине седиментации или сохранения более крупных комплексов (относительно), количество poly(I:C) в каждом отдельном препарате ВО-111 количественно определяли с помощью спектрофотометрического анализа при длине волны 260 нм, чтобы корректно сравнить эффекты такого препарата, оказываемые на клетки, путем разбавления в соответствии с исходным препаратом до подходящей концентрации. Количественно сходные данные получены путем исследования клеточной гибели через 12, 24 и 36 ч. Клеточную гибель определяли с помощью анализа с трипановым синим, как описано в литературе. Среднее квадратичное отклонение рассчитывали с использованием данных трехкратной повторности для каждого условия одного и того же эксперимента.

Фиг. 2 - влияние характеристик PEI на функциональную активность ВО-111, определенные с использованием тех же клеточного анализа и концентрации ВО-111, что на фиг. 1. (A) Отдельные препараты ВО-111 получали с использованием коммерческих препаратов JetPEI, содержащих линейные полимеры с различной молекулярной массой (выраженной в килодальтонах; NT: контроль, необработанные клетки; такие препараты JetPEI характеризуются мономодальным распределением с коэффициентом полидисперсности, который составляет ниже 1,5, в частности составляет от 1,1 до 1,4). (B) Отдельные препараты ВО-111 получали путем модифицирования соотношения N/P (от 1,2 до 5,3), которое рассчитывали следующим образом: $\text{мкл PEI} \times 150 \text{ нМ/мкг poly(I:C)} \times 3 \text{ нмоль}$, где 150 нМ относится к концентрации азотных остатков PEI, и 3 нмоль относится к количеству наномолей анионного фосфата на 1 мкг poly(I:C). Фармакологический эффект каждой комбинации определяли путем сравнения процентных долей клеточной гибели как в клетках меланомы, так и в меланоцитах (контрольные клетки; NT: контроль, необработанные клетки). Тот же препарат poly(I:C), что описан на фиг. 1, применяли для всех препаратов ВО-111, которые описаны на (A) и (B), но вместо применения способа "быстрого пипетирования" раствор poly(I:C) быстро инъецировали во флакон, содержащий раствор PEI, с использованием шприца, увеличивая скорость перемешивания (по меньшей мере, как можно определить визуально). Среднее квадратичное отклонение рассчитывали с использованием данных трехкратной повторности для каждого условия одного и того же эксперимента.

Фиг. 3 - анализ молекул poly(I:C) в препаратах ВО-111 с помощью электрофореза. (A) Немеченые препараты исходных молекул poly(I) или poly(I:C) сравнили с увеличивающимися количествами препаратов ВО-111 в 0,8% агарозном геле (1 ч электрофореза). Молекулярный размер молекул poly(I:C) определяли при сравнении с маркерами размера. (B) Молекулы poly(I:C) с радиоактивной меткой сравнили с немеченой poly(I:C) и препаратом ВО-111, включающим такую же poly(I:C) с радиоактивной меткой, с использованием 1% агарозного геля (1 ч электрофореза), который подвергли воздействию фотографической пленки. Молекулы poly(I:C) в разных препаратах ВО-111, которые не видны на панели (A), появляются на панели (B) при блокировании в лунке с агарозным гелем, поскольку они связаны с частицами, образующими JetPEI, которые (ввиду их размера и/или распределения заряда) не могут перемещаться в

агарозном геле под действием электрического поля. (С) Немеченные молекулы poly(I:C) сравнили с отдельными препаратами ВО-111, полученными путем модифицирования соотношения N/P (1,2, 3 и 5,3; данное значение рассчитывали, как на фиг. 2) в 0,8% агарозном геле (1 ч электрофореза). Каждый образец представлен либо необработанным (С+), либо обработанным специфически разрушающим ферментом (РНКаза; РНКаза А: 5 мкг/мл в течение 30 мин) перед помещением в агарозный гель для оценки стабильности молекул poly(I:C) в различных препаратах ВО-111. Молекулы poly(I:C) проявляют нечувствительность к такому ферменту при образовании комплекса с JetPEI при более высоких соотношениях N/P (больше или равных 3), и появляется смазанный след от высвобождающихся молекул poly(I:C) при соотношении N/P, составляющем ниже 3. На панелях (А) и (С) молекулярный размер молекул poly(I:C) определяли при сравнении с маркером размера.

Фиг. 4 - распределение по размеру комплексов ВО-111 в препаратах, которые получены с применением способа получения с 2 флаконами, определенное путем сравнения интенсивности сигнала с помощью динамического рассеяния света по технологии Zeta sizer Nano ZS. (А) Сравнение распределения частиц по диаметру выполняли с использованием трех различных партий ВО-111, полученных с помощью одного и того же способа получения. (В) Сравнение отдельных препаратов ВО-111 при воздействии (или нет, образец отмечен как КОНТРОЛЬ) инкубирования при комнатной температуре и при встряхивании в течение 30 мин. (С) Сравнение отдельных препаратов ВО-111 при воздействии (или нет, образец отмечен как КОНТРОЛЬ) путем инкубирования при температуре 50°C в течение периода времени 30 мин. (D) Сравнение отдельных препаратов ВО-111, контрольного образца, полученного согласно примеру 1, и образца, полученного с помощью "медленного перемешивания", оцениваемых по профилям трехкратной повторности, при этом получение осуществляли при помощи подхода "капля за каплей" с уменьшенной скоростью перемешивания. Размер частиц оценивали, рассматривая диаметр частиц в нанометрах (d, nm).

Фиг. 5 - схема получения соединений ВО-11X согласно GMP, проиллюстрированная на примере ВО-112. (А) Структурная схема, на которой кратко изложены основные стадии получения соединений ВО-112 как соответствующего GMP фармацевтического препарата, содержащего молекулы poly(I:C), коммерческие препараты JetPEI и глюкозу. (В) Эксклюзионные хроматограммы для образцов ВО-112, JetPEI и глюкозы, которые анализировали с помощью определения рефракционного индекса (RI). Сигнал ВО-112 перекрывается сигналом глюкозы, при этом характерный пик свободного JetPEI исчез при удерживаемом объеме, составляющем 13,75 мл, что указывает на то, что весь исходный JetPEI был включен в ВО-112. (С) Модификация распределения соединения ВО-112 благодаря увеличенной скорости перемешивания во время процесса получения при низкой (ниже 100 rpm) или высокой (сверх 100 rpm, вплоть до 550 rpm) скорости инъектирования, где 550 rpm является референсной скоростью перемешивания растворов в способе получения ВО-112, что служит для получения частиц с z-средним диаметром (d, nm), составляющим от примерно 100 до 73 nm, 54 nm или меньше (функциональные препараты ВО-112 характеризуются средним диаметром, составляющим от 30 до 150 nm; диаметр частицы задан, как на предыдущих фигурах, в d, nm).

Фиг. 6 - структурный анализ различных составов на основе poly(I:C). (А) Молекулярный размер различных препаратов poly(I:C) определяли в агарозном геле с помощью маркеров размера. (В) Распределение по размеру комплексов ВО-112 сравнили с тремя poly(I:C)-содержащими коммерческими продуктами (Poly-ICI:C, LyoVec-HMW и LyoVec-LMW; размер частиц задан, как на предыдущих фигурах, в nm).

Фиг. 7 - изменения в распределении по размеру после хранения при -20°C определяли в отношении ВО-112 (А), Poly-ICI:C (В), LyoVec-HMW (С) и LyoVec-LMW (D), как определяли путем сравнения интенсивности сигнала с применением технологии Nanosizer (размер частиц задан, как на предыдущих фигурах, в nm).

Фиг. 8 - влияние различных составов на основе poly(I:C) на клеточную жизнеспособность в двух отдельных моделях раковых клеток. ВО-112 сравнивали с необработанными клетками и клетками, обработанными Poly-ICI:C, LyoVec-LMW или LyoVec-HMW, при этом каждый состав тестировали при заданных концентрациях, которые определяли согласно весу комплекса, но с одинаковым содержанием молекул poly(I:C), либо в модели клеток меланомы (А), либо рака поджелудочной железы (В). Данные по клеточной жизнеспособности получали с помощью способа проведения анализа с кристаллическим фиолетовым спустя 24 ч. (С) Влияние разных составов на основе poly(I:C) на сигнальные молекулы, представляющие терапевтический интерес. Экспрессию интерферона-бета (IFN-β) оценивали с помощью способа RT-qPCR в клетках SK-MEL-103, которые подвергали воздействию ВО-112, Poly-ICI:C (или необработанных, NT) в течение 8, 16 и 24 ч. Составы на основе ВО-112 и Poly-ICI:C применяли в концентрации, обеспечивающей сходное содержание молекул poly(I:C).

Фиг. 9 - влияние линейного PEI отдельно, poly(I:C) и двух разных составов на основе PEI/poly(I:C) (ВО-110 и ВО-112) на жизнеспособность нормальных первичных меланоцитов (препараты № 1 и № 2) и четырех линий раковых клеток, демонстрирующий специфичную цитотоксичность таких составов на основе PEI/poly(I:C) против линий раковых клеток. Содержание poly(I:C), используемое во вводимом препарате poly(I:C) отдельно, при обработках ВО-110 и ВО-112 является идентичным (1 мкг/мл на 40 ч обработки).

Фиг. 10 - влияние введения ВО-112 в животной модели для человеческого рака. (А) Шкала времени, представляющая схему лечения. Всем мышам инъецировали подкожно клетки мышиной меланомы В16-F10 в день 0. После рандомизации на 7 день мышей разделили на пять групп, характеризующихся опухолями сходного среднего размера (80-100 мм³), животным проводили обработку с помощью состава на основе ВО-112 (двойные круги) путем инъекции прямо в опухолевую ткань (i.t. обработка) в 3 различных концентрациях в группах 2, 3 и 4 (G2, G3, G4) или в двух остальных группах (G1 и G5) только носителем. В последующие дни проведения обработки (10, 14, 17, 21 и 24) все группы, кроме G1, получали интраперитонеальное (i.p.) введение мышиного антитела к PD-L1 (150 мкг/доза) в дополнение к интратуморальному введению состава на основе ВО-112 в той же концентрации в день 7. Ежедневно контролировали выживаемость и мышей считали мертвыми после нахождения их умершими или когда объем опухоли достигал максимально допустимого размера. Контроль продолжали после последней обработки до дня 45, когда последняя мышь умерла, и эксперимент был прекращен. (В) Кривая выживаемости, на которой сравниваются контрольные группы G1 и G5 с тремя группами, в которых вводили состав на основе ВО-112 в заданных трех концентрациях. При сравнении групп имелась статистическая разница ($p < 0,0001$, логарифмический ранговый критерий Кокса-Мантеля) между контрольными группами и исследуемыми группами, при этом G4 показала наиболее высокое увеличение выживаемости относительно носителя или антитела к PD-L1 отдельно.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата;

(ii) по меньшей мере 95% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм, предпочтительно менее или равным 300 нм; и

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 200 нм, предпочтительно менее или равным 150 нм, в частности, измеренным согласно ISO 22412.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к водной композиции, содержащей частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], и средняя молекулярная масса указанного линейного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа;

(ii) по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 300 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 150 нм, измеренным согласно ISO 22412; и

(iv) указанная композиция характеризуется дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, согласно ISO 13099.

Настоящее изобретение также относится к водной композиции, содержащей частицы, раскрытые в настоящем документе, где

(i) каждая из указанных частиц образована путем получения комплекса по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], и средняя молекулярная масса указанного линейного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа;

(ii) по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 300 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 150 нм, измеренным согласно ISO 22412; и

(iv) указанная композиция характеризуется дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, согласно ISO 13099;

где указанные частицы образованы при соотношении количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида в указанной композиции, равном или составляющем более 2,5.

Частицы, которые выполнены из указанных комплексов и образованы за счет них, могут проявлять дополнительные характеристики в соответствии с раскрытием ниже по тексту, так что в дополнительных вариантах осуществления указанные частицы могут содержать дополнительные компоненты, например наполнители, такие как маннит или глюкоза, или не содержать дополнительные элементы, такие как обеспечивающие нацеливание на рак функциональные элементы или другие фрагменты и линкеры. Дополнительные характеристики можно определять в дополнительных предпочтительных вариантах осуществления, когда частицы предусматривают и анализируют в композициях [т.е. в жидких (водных) или

лиофилизированных составах], которые, как определено, характеризуются мономодальным распределением по размеру в конкретных диапазонах, например от 30 до 150 нм, или когда композиция характеризуется отсутствием молекул одноцепочечных полирибонуклеотидов (как установлено посредством низкого гиперхромного эффекта или его отсутствия). Другие характеристики, определенные в соответствии с международными утвержденными стандартами, которые требуются для официального одобрения и/или Правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств, раскрыты далее.

В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению по меньшей мере 40% двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют по меньшей мере 850 пар оснований и по меньшей мере 50% двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанных частицах, имеют от 400 до 5000 пар оснований. Кроме того, двухнитевые полирибонуклеотиды, которые содержатся в комплексах, могут представлять конкретные диапазоны значений длины, которые определяются способами их получения и/или согласно требуемому применению. Например, по меньшей мере 40, 50, 60% или любая другая более высокая процентная доля двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанных частицах, может иметь по меньшей мере 850 пар оснований, и по меньшей мере 50, 60, 70% или любая другая более высокая процентная доля двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанных частицах, может иметь от 400 до 5000 пар оснований. Дополнительные диапазоны, которые могут определять двухнитевые полирибонуклеотиды, которые содержатся в указанных частицах, составляют

(i) от 5 до 60% (и предпочтительно от 10 до 30%) двухнитевых полирибонуклеотидов, имеющих менее 400 пар оснований;

(ii) от 20 до 45% (или от 15 до 30%, но предпочтительно от 20 до 30%) двухнитевых полирибонуклеотидов, имеющих от 400 до 850 пар оснований;

(iii) от 20 до 70% (и предпочтительно от 50 до 60%) двухнитевых полирибонуклеотидов, имеющих от 850 до 5000 пар оснований; и/или

(iv) от 0 до 10% (и предпочтительно 1% или меньше) двухнитевых полирибонуклеотидов, имеющих более 5000 пар оснований.

Таким образом, в более предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению по меньшей мере 50% двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют по меньшей мере 850 пар оснований, и по меньшей мере 60% двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют от 400 до 5000 пар оснований. Еще более предпочтительно по меньшей мере 60% двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют от 400 до 5000 пар оснований, и от 20 до 45% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 850 пар оснований. Еще более предпочтительно по меньшей мере 60% двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов, которые содержатся в указанной композиции, имеют от 400 до 5000 пар оснований, от 20 до 30% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 850 пар оснований и от 10 до 30% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют менее 400 пар оснований.

В одном варианте осуществления по настоящему изобретению двухнитевой полирибонуклеотид предпочтительно представляет собой молекулы полиинозиновой-полицитидиловой кислоты [poly(I:C)] или молекулы полиадениловой-полиуридиловой кислоты [poly(A:U)]. Более предпочтительно двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой молекулы полиинозиновой-полицитидиловой кислоты [poly(I:C)]. Указанные молекулы двухнитевых полирибонуклеотидов содержат нити, например, poly(I) и poly(A), которые спариваются с poly(C) и поли (U), соответственно, образуя таким образом двухнитевые полирибонуклеотиды, где каждая нить может содержать до 5% рибонуклеотидов, отличных от большинства рибонуклеотидов в указанной нити, и/или содержать до 5% неправильно спаренных пар оснований, более предпочтительно до 1% рибонуклеотидов, отличных от большинства рибонуклеотидов в указанной нити, и/или содержать до 1% неправильно спаренных пар оснований. В зависимости от выбранного полирибонуклеотида и/или способа получения указанных комплексов фракция полирибонуклеотидов, которые содержатся в комплексе, также может включать одноцепочечные (т.е. неспаренные) полирибонуклеотиды.

В предпочтительном варианте осуществления содержание свободного, одноцепочечного полирибонуклеотида в данных частицах и композициях оценивают на основе гиперхромизма (или гиперхромного эффекта). Данный эффект имеет место благодаря увеличению оптической плотности (поглощения) двухцепочечных полинуклеотидов, когда денатурируется данная дуплексная структура. Поглощение УФ (ультрафиолетового) излучения полинуклеотидов увеличивается, когда две отдельные нити разделяются с помощью либо нагревания, либо добавления денатурирующего вещества, либо увеличения уровня pH. Гиперхромизм, таким образом, можно применять для проверки структур молекул poly(I:C) или poly(A:U) в частицах при изменении температуры (или другого условия), определяя, соответственно, разделение нитей poly(I) и нитей poly(C) в молекулах poly(I:C) или разделение нитей поли(A) и нитей

поли(U) в молекулах поли(A:U). Предпочтительно такое содержание одноцепочечных молекул poly(I) и молекул poly(C), или одноцепочечных молекул poly(A) и молекул poly(U) в частицах является настолько низким, насколько это возможно, как определено с помощью измерения поглощения света в области длины волны 260 нм с использованием стандартного оборудования и протоколов. Например, данный эффект можно измерять с использованием спектрофотометра и в соответствии с Европейской фармакопеей (2.2.25; Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях). В частности, композиции, раскрытые в настоящем документе, проявляют менее чем 20% увеличение поглощения при 260 нм и температуре от 20 до 80°C, предпочтительно менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5%, еще более предпочтительно менее чем 1% увеличение поглощения при 260 нм и температуре от 20 до 80°C. Альтернативно композиции, раскрытые в настоящем документе, показывают увеличение коэффициента пропускания, составляющее менее чем 0,2, при температуре от комнатной температуры до 40, 50, 60, 70, 80 и 90°C. Данное значение можно измерять как поглощение при 260 нм (A) или коэффициент пропускания (1/A) при комнатной температуре, а затем рассчитать разницу между соответствующим значением поглощения или коэффициента пропускания при упомянутых ранее более высоких температурах.

В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению полиалкиленимин или его соль и/или сольват являются линейными, разветвленными и/или дендритными, более предпочтительно указанный полиалкиленимин является линейным полиалкиленимином. В более предпочтительном варианте осуществления указанный полиалкиленимин представляет собой гомополиалкиленимин или гетерополиалкиленимин. Поликатионный гомо- или гетерополимер предпочтительно содержит повторяющуюся единицу, образованную аминогруппой и спейсером по меньшей мере из двух атомов углерода, таким образом содержит полимеры, представляющие собой гомополиалкиленимин или гетерополиалкиленимин, которые являются линейными, или разветвленными, и/или дендритными. Примеры полиалкилениминов представляют собой полиэтиленимин, полипропиленимин, полибутиленимин и полипентиленимин, смешанные полимеры из любых этих гомополимеров или любые коммерчески доступные или иным образом раскрытые производные. Данный полимер, представляющий собой полиалкиленимин, предпочтительно является водорастворимым. В особенно предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанный полиалкиленимин представляет собой водорастворимый линейный гомополиалкиленимин или гетерополиалкиленимин. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный полиалкиленимин содержит, в частности, водорастворимый линейный гомополиалкиленимин, более предпочтительно он содержит по меньшей мере 75% линейных полиэтилениминов, еще более предпочтительно 95% линейных полиэтилениминов. Все же в еще более предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению указанный полиалкиленимин представляет собой полиэтиленимин (известный также как PEI). Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления указанный полиалкиленимин представляет собой линейный полиэтиленимин.

В другом предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению средневесовая молекулярная масса указанного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа, еще более предпочтительно от 17,5 до 22,6 кДа, при этом он характеризуется коэффициентом полидисперсности по молекулярной массе, составляющим $<1,5$. Указанную средневесовую молекулярную массу и указанный коэффициент полидисперсности определяли в отношении предшественника указанного полиалкиленимина, представляющего собой полиалкиленоксид, согласно ISO 16014:2012, предпочтительно с помощью гелепроникающей хроматографии (GPC) согласно ISO 16014-2:2012. Коэффициент полидисперсности рассчитывали как M_w/M_n (средневесовая молекулярная масса/среднечисловая молекулярная масса), и он составлял ниже 1,5.

В другом предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида в указанной композиции равно или составляет более 2,5, более предпочтительно от 2,5 до 5,5, еще более предпочтительно от 2,5 до 4,5, наиболее предпочтительно от 2,5 до 3,5. Данное соотношение особенно важно при формировании частиц в композиции и обеспечении композиций с необходимыми эффектами и свойствами.

Таким образом, как упомянуто выше, настоящее изобретение относится к водной композиции, содержащей частицы, раскрытые в настоящем документе, где

(i) каждая из указанных частиц образована путем получения комплекса по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], и средняя молекулярная масса указанного линейного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа;

(ii) по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 300 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 150 нм, измеренным согласно ISO 22412; и

(iv) указанная композиция характеризуется дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, согласно ISO 13099;

где указанные частицы образованы при соотношении количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида в указанной композиции, равном или составляющем более 2,5, более предпочтительно от 2,5 до 5,5, еще более предпочтительно от 2,5 до 4,5, наиболее предпочтительно от 2,5 до 3,5. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления указанная композиция образована путем получения комплекса по меньшей мере из 0,5 мг полиинозиновой-полицитидиловой кислоты [poly(I:C)] на 1 мл общего (т.е. конечного) объема указанной композиции, более предпочтительно по меньшей мере от 2,0 мг poly(I:C) на 1 мл общего объема указанной композиции. Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)] или полиадениловую-полиуридиловую кислоту [poly(A:U)], где по меньшей мере 60% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют по меньшей мере 850 пар оснований (bp), по меньшей мере 70% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 5000 пар оснований и от 20 до 45% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 850 пар оснований; и полиалкиленимин содержит по меньшей мере 95% полиэтилениминов, где средневесовая молекулярная масса указанного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа, и коэффициент полидисперсности составляет $<1,5$, и при этом соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанной композиции (т.е. соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанных частиц), составляет от 2,5 до 5,5.

В особенно предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], где по меньшей мере 60% молекул poly(I:C) имеют по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанных молекул poly(I:C) имеют от 400 до 5000 пар оснований, от 20 до 30% указанных молекул poly(I:C) имеют от 400 до 850 пар оснований и от 10 до 30% указанных молекул poly(I:C) имеют менее 400 пар оснований; и полиалкиленимин представляет собой полиэтиленимин, где средневесовая молекулярная масса указанного полиалкиленимина составляет от 17,5 до 22,6 кДа, и коэффициент полидисперсности составляет $<1,5$ (как, например, от 0,1 до 0,6, как измерено в композиции), и при этом соотношение количества молей азота указанного полиэтиленимиона и количества молей фосфора указанной poly(I:C), применяемых в образовании указанной композиции (т.е. соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанных частиц), составляет от 2,5 до 4,5.

В настоящем изобретении z-средний диаметр и коэффициент полидисперсности диаметров частиц, которые содержатся в композиции по настоящему изобретению, определяют с помощью методик динамического рассеяния света (DLS), основанных на предположении, что указанные частицы являются изотропными и имеют сферическую форму. В частности, z-средний диаметр (зета-средний диаметр) относится к измеренному по интенсивности среднеарифметическому гидродинамическому диаметру указанных частиц, определенному согласно промышленному стандарту ISO 22412:2008. В дополнение промышленный стандарт ISO 22412:2008 предусматривает измерение распределения частиц по диаметру (размеру) в форме коэффициента полидисперсности и позволяет рассчитать проценти́ли (D-значения), известные как D50% (максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 50%, также известный как медианный диаметр), D90% (максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 90%), D95% (максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 95%) и D99% (максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 99%). Таким образом, на основании методологии, изложенной в ISO 22412, возможно установить, что по меньшей мере 95% (D95) или предпочтительно 90% (D90) частиц, которые содержатся в композиции по настоящему изобретению, характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм, более предпочтительно менее или равным 300 нм, и что указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 200 нм, более предпочтительно менее 150 нм.

В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению указанные частицы характеризуются мономодальным распределением по диаметру, в частности, в субмикрометровом диапазоне, как отмечено выше. Действительно, в одном аспекте водная композиция по настоящему изобретению содержит частицы, где по меньшей мере 90% указанных частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 300 нм, где указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим менее или равным 150 нм, измеренным согласно ISO 22412. Частицы (или их агрегаты), характеризующиеся размером, превышающим такие значения (например, в микрометровом диапазоне, как, например, больше 10 мкм), которые все еще могут присутствовать (но в любом случае ниже пределов, отмеченных в Европейской фармакопее), можно удалять с помощью фильтрации на завершающей стадии процесса получения и/или непосредственно перед введением (например, через

фильтр 0,8 мкм). Таким образом, все или значительное большинство частиц, которые содержатся в данной композиции, могут проявлять мономодальное распределение по диаметру в композиции, которое, как показано в примерах, устанавливается во время их получения, и его можно поддерживать и адаптировать в соответствии с необходимым применением и/или хранением.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 95 или 90% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм (т.е. максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 95 или 90% = D95% или D90% = 600 нм), более предпочтительно не превышающим диаметр 500 нм, еще более предпочтительно не превышающим диаметр 400 нм и еще более предпочтительно не превышающим диаметр 300 нм. В таких пределах даже более предпочтительно по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм, еще более предпочтительно по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 500 нм, намного более предпочтительно по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 400 нм, и еще более предпочтительно не превышающим диаметр 300 нм. С другой стороны, в предпочтительном варианте осуществления указанные частицы характеризуются медианным диаметром (D50%), составляющим от 75 до 150 нм, более предпочтительно от 80 до 130 нм, и D90%, составляющим от 140 до 250 нм, более предпочтительно от 170 до 240 нм.

В другом предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанные частицы характеризуются z-средним диаметром меньше 150 нм и более предпочтительно z-средним диаметром из диапазонов, которые включают в себя значения от 30 до 150 нм (как, например, еще более предпочтительно от 50 до 150 нм, от 75 до 150 нм, от 50 до 100 нм, от 100 до 150 нм или от 60 до 130 нм). Более предпочтительно указанные частицы водной композиции по настоящему изобретению характеризуются мономодальным распределением по диаметру, составляющим от 30 до 150 нм.

Таким образом, в наиболее особенно предпочтительных вариантах осуществления: (i) по меньшей мере 99% частиц, которые содержатся в композиции по настоящему изобретению, характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм, где указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим от 30 до 150 нм; и (ii) по меньшей мере 99% частиц, которые содержатся в композиции по настоящему изобретению, характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 500 нм, при этом указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим от 60 до 130 нм, и характеризуются медианным диаметром (D50%), составляющим от 75 до 150 нм.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанную композицию получают путем лиофилизации водных композиций, раскрытых в настоящем документе. Таким образом, композиция по настоящему изобретению может представлять собой водную или лиофилизированную композицию. Таким образом, композиция по настоящему изобретению (далее состав на основе BO-11X, где X может представлять собой целое число, так что состав на основе BO-11X охватывает, например, составы на основе BO-111 и BO-112) может быть представлена в твердой (в виде лиофилизированной или другой высококонцентрированной формы частиц), полутвердой (в виде геля) или жидкой форме, но она предпочтительна в виде жидкой композиции (такой как водная композиция или другой тип суспензии частиц, которую можно инъецировать или вдыхать). Составы на основе BO-11X можно применять, перевозить и хранить как таковые или можно использовать для получения лиофилизированной формы для конкретных применений, перевозки, хранения, введения с другими соединениями и/или для дополнительных технических требований. Что касается способа лиофилизации и оборудования для этого, то можно адаптировать классическое замораживание-высушивание или более современные способы (такие как электрозамораживание, контролируемый при помощи ультразвука, или ледяной туман) для обращения с составами на основе BO-11X и их получения, а также путем изменения параметров, таких как pH, скорость высушивающего воздуха, время, влажность, давление или температура.

Таким образом, в одном наиболее предпочтительном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению содержит частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где

(a) указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)] или полиадениловую-полиуридиловую кислоту [poly(A:U)], где по меньшей мере 60% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 5000 пар оснований и от 20 до 45% указанных двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 850 пар оснований; и

(b) указанный полиалкиленимин содержит по меньшей мере 95% полиэтилениминов, где средняя молекулярная масса указанного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа, и коэффициент полидисперсности составляет <1,5, и при этом соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанной композиции (т.е. соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина

и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанных частиц), составляет от 2,5 до 5,5;

(ii) по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм, предпочтительно по меньшей мере 95% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 400 нм; и

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим от 30 до 150 нм.

В другом наиболее предпочтительном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению представляет собой водную композицию, которая содержит частицы, где

(i) каждая из указанных частиц содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где

(a) указанный двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую полицитидиловую кислоту [poly(I:C)], где по меньшей мере 60% указанной poly(I:C) имеет по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% указанной poly(I:C) имеет от 400 до 5000 пар оснований и от 20 до 45% указанной poly(I:C) имеет от 400 до 850 пар оснований; и

(b) указанный полиалкиленимин представляет собой полиэтиленимин (PEI), где средневесовая молекулярная масса указанного PEI составляет от 17,5 до 22,6 кДа и коэффициент полидисперсности составляет $<1,5$, и при этом соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанной композиции (т.е. соотношение количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанных частиц), составляет от 2,5 до 4,5;

(ii) по меньшей мере 99% указанных частиц характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 500 нм, предпочтительно по меньшей мере 95 или 90% указанных частиц характеризуются модальным распределением по диаметру менее 300 нм;

(iii) указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим от 60 до 130 нм; и

(iv) указанные частицы характеризуются медианным диаметром ($D_{50\%}$), составляющим от 75 до 150 нм.

Составы на основе ВО-11Х в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения могут быть предусмотрены в виде композиций, дополнительно содержащих фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, органический растворитель и/или вспомогательное вещество [такое как глицерин, этанол, глюкозу или маннит, предпочтительно глюкозу или маннит, более предпочтительно в концентрации от 1 до 10% (вес./об.)] [т.е. где указанная композиция образована путем дополнительного добавления глюкозы или маннита в концентрации от 1 до 10% (вес./общий объем указанной композиции)], которые наилучшим образом адаптированы к предпочтительной конечной форме (такой как жидкая или лиофилизированная), применениям, перевозке, хранению, введению с другими соединениями и/или дополнительным техническим требованиям. В более предпочтительном варианте осуществления указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из органического соединения, неорганического соединения, нуклеиновой кислоты, аптамера, пептида или белка.

В одном аспекте водная композиция по настоящему изобретению характеризуется дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, предпочтительно от 35 до 50 мВ или от 38 до 45 мВ, еще более предпочтительно от 40 до 45 мВ, согласно ISO 13099.

В другом варианте осуществления композиции по настоящему изобретению указанная композиция представляет собой водную композицию, которая характеризуется

(i) значением pH, составляющим от 2 до 4;

(ii) осмолярностью, составляющей от 200 до 600 мОсм/кг;

(iii) удельным оптическим вращением, составляющим от $+1500$ до $+3750^\circ \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{дм}^{-1}$ при длине волны 589 нм при температуре 20°C , когда указанная водная композиция содержит 5% (вес./об.) D-глюкозы в воде, рассчитанным относительно воды; и/или

(iv) дзета-потенциалом, составляющим более или равным 30 мВ (например, который находится в диапазоне от 35 до 50 мВ).

В еще более предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанная композиция представляет собой водную композицию, которая характеризуется

(i) значением pH, составляющим от 2 до 4;

(ii) осмолярностью, составляющей от 200 до 600 мОсм/кг; и/или

(iii) дзета-потенциалом, составляющим более или равным 30 мВ (например, который находится в диапазоне от 35 до 50 мВ).

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления указанная композиция представляет собой водную композицию, содержащую глюкозу или маннит, которая характеризуется

(i) значением pH, составляющим от 2 до 4; и/или

(ii) осмолярностью, составляющей от 200 до 600 мОсм/кг.

В одном дополнительном предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению

указанная композиция представляет собой водную композицию, содержащую глюкозу, которая характеризуется

- (i) значением pH, составляющим от 2,7 до 3,4;
- (ii) осмолярностью, составляющей от 200 до 340 мОсм/кг; и/или
- (iii) дзета-потенциалом, который находится в диапазоне от 35 до 50 мВ или от 38 до 45 мВ, еще более предпочтительно от 40 до 45 мВ.

В альтернативном дополнительном предпочтительном варианте осуществления указанная композиция представляет собой водную композицию, содержащую маннит, которая характеризуется

- (i) значением pH, составляющим от 2,7 до 3,4;
- (ii) осмолярностью, составляющей от 200 до 600 мОсм/кг; и/или
- (iii) дзета-потенциалом, который находится в диапазоне от 35 до 50 мВ или от 38 до 45 мВ, еще более предпочтительно от 40 до 45 мВ.

Для целей настоящего изобретения значения осмолярности, заявленные в настоящем документе, являются строго значениями осмолярности, но поскольку плотность воды (растворителя, в котором получены водные композиции по настоящему изобретению) примерно равна 1,00 г/мл при 20°C, эти термины используются взаимозаменяемо. Для целей настоящего изобретения комнатная температура относится к температуре в диапазоне от 20 до 25°C.

В настоящем изобретении дзета-потенциал измеряют согласно ISO 13099, предпочтительно 13099-2:2012.

Настоящее изобретение также относится к композиции, раскрытой в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Аналогично настоящее изобретение, следовательно, также относится к применению композиции, раскрытой в настоящем документе, для получения лекарственного препарата. Данного применения можно достичь путем обеспечения композиции в виде жидкой (водной) или лиофилизированной композиции, где молекулы poly(I:C) и частицы, содержащие их, находятся в высокостабильной форме и при высокой концентрации, например, где указанная композиция образована путем получения комплекса с использованием по меньшей мере 0,5 мг, 0,7 мг/мл, 0,9 мг/мл, вплоть до 2,0 мг полиинозиновой-полицитидиловой кислоты [poly(I:C)] или полиадениловой-полиуридилловой кислоты [poly(A:U)] или больше на мл общего (т.е. конечного) объема указанной композиции.

Данные композиции особенно адаптированы для прямого введения к раковым клеткам, например, посредством средств для интратуморальной или перитуморальной инъекции в кожу, или во внутренний орган, или в ткань, содержащие такие опухоли и раковые клетки. В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанный лекарственный препарат является инъекционным. В более предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанный лекарственный препарат является инъекционной водной композицией, необязательно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество. Данную инъекционную водную композицию можно предусматривать как таковую или после разбавления концентрированного препарата молекул poly(I:C) или поли(A:U) (при соответствующей концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 мг poly(I:C) или поли(A:U)/мл общего объема композиции, которую предстоит получить, или больше, как установлено при получении частиц касательно соответствующего веса молекул poly(I:C) или поли(A:U), которые добавлены к данному объему раствора) или лиофилизированной композиции для получения общего объема композиции по настоящему изобретению. Это означает, что указанная композиция предусмотрена в установленных выше концентрациях, определенных касательно веса poly(I:C) или poly(A:U), применяемых в получении комплекса, на объем общей водной композиции, но ее можно по необходимости концентрировать, особенно для длительного хранения и/или интратуморального введения. В частности, состав на основе ВО-11Х с двухнитевыми молекулами poly(I:C) при таких высоких концентрациях (т.е. который получен из частиц, содержащих комплекс, сформированный путем образования комплекса от по меньшей мере 0,5 мг вплоть до 0,7 мг, предпочтительно 0,9 мг, более предпочтительно 2,0 мг или больше poly(I:C) с линейным PEI на 1 мл общей водной композиции) является наиболее подходящим для введения и применения в качестве лекарственного препарата. Интратуморальная или перитуморальная инъекция такой композиции (также в зависимости от фактической доступности и/или размера опухолевой массы, оцениваемой практикующим врачом) в одну или более небольших или ограниченных локализаций, где присутствуют опухоли и раковые клетки, может обеспечивать более сильный и/или более своевременный терапевтический эффект.

Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, раскрытой в настоящем документе, для применения в лечении нарушения клеточного роста, характеризующегося аномальным ростом клеток человека или животного. Такое лечение может включать комбинированное введение композиции по настоящему изобретению с другим терапевтическим лечением, таким как другое специфичное в отношении рака лекарственное средство (которое является, например, антителом, нацеливающимся на раковый антиген, или противораковой вакциной), или стандартный вид лечения (такой как лучевая терапия или химиотерапия). Комбинированное введение может обеспечивать не только суммарный терапевтический эффект, но также другие значимые эффекты, такие как уменьшение дозировки другого

лекарственного средства, необходимой для достижения одинаковой терапевтической пользы, уменьшение побочных эффектов или обеспечение долговременного и/или синергичного эффекта в отношении опухолей и раковых клеток. Аналогично настоящее изобретение, следовательно, также относится к применению композиции, раскрытой в настоящем документе, для получения лекарственного препарата для лечения нарушения клеточного роста, характеризующегося аномальным ростом клеток человека или животного. Для целей настоящего изобретения аномальный рост характеризуется неконтролируемым делением и/или дифференциацией клеток.

В более предпочтительном варианте осуществления указанное нарушение клеточного роста представляет собой рак или гинекологическое нарушение, характеризующееся аномальным ростом клеток репродуктивных органов особей женского пола млекопитающих. Рак, который относится к настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой один или более из базальноклеточной карциномы; рака желчных протоков; рака мочевого пузыря; рака кости; рака мозга и центральной нервной системы; рака молочной железы; рака брюшины; хориокарциномы; рака соединительной ткани; рака пищеварительной системы (в том числе рак пищевода, желудка, толстой кишки, прямой кишки или другой вид рака желудочно-кишечного тракта); рака глаза; рака головы и шеи; глиобластомы; карциномы печени; гепатомы; интраэпителиальной неоплазии; рака почки, надпочечника или ренального рака; лейкемии; рака печени; рака легкого (например, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого и плоскоклеточной карциномы легкого); меланомы; миеломы; нейробластомы; рака полости рта (например, рака губы, гортани, языка, ротовой полости или глотки); рака поджелудочной железы; рака предстательной железы; ретинобластомы; рабдомиосаркомы; рака дыхательной системы; карциномы слюнной железы; рака кожи; плоскоклеточного рака; рака яичка; рака щитовидной железы; рака матки, эндометрия, шейки матки, вульвы, яичника или другого гинекологического рака; рака мочевыделительной системы; лимфомы, в том числе В-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (NHL; в том числе конкретных типов, таких как низкодифференцированная/фолликулярная, мелкоклеточная лимфоцитарная, среднедифференцированная/фолликулярная, среднедифференцированная диффузная, высокодифференцированная иммуннобластная, высокодифференцированная лимфобластная, высокодифференцированная мелкоклеточная с нерассечёнными ядрами или генерализованная NHL); лимфомы из клеток мантийной зоны и СПИД-ассоциированной лимфомы; хронической лимфоцитарной лейкемии; острой лимфобластной лейкемии; волосатоклеточного лейкоза; хронического миелобластного лейкоза; а также других видов карциномы и саркомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (PTLD), а также аномальной сосудистой пролиферации, ассоциированной с факоматозами или отеком (такими как ассоциированные с опухолями мозга). Более предпочтительно указанный рак выбран из одного или более из рака мочевого пузыря; рака кости; рака мозга и центральной нервной системы; рака молочной железы; рака пищеварительной системы (в том числе рака пищевода, желудка, толстой кишки, прямой кишки или другого рака желудочно-кишечного тракта); рака головы и шеи; глиобластомы; карциномы печени; гепатомы; рака почки, надпочечника или ренального рака; лейкемии; рака печени; рака легкого; меланомы; миеломы; нейробластомы; рака поджелудочной железы; рака предстательной железы; рака дыхательной системы; рака кожи; рака яичка; рака щитовидной железы; рака матки, эндометрия, шейки матки, вульвы, яичника или другого гинекологического рака; рака мочевыделительной системы; лимфомы или лейкемии. Еще более предпочтительно указанный рак выбран из одного или более из карциномы, глиомы, меланомы или саркомы, даже более предпочтительно меланомы, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака молочной железы, или рака поджелудочной железы, или в качестве альтернативы меланомы или рака поджелудочной железы.

Репродуктивные органы особей женского пола млекопитающих, относящиеся к настоящему изобретению, представляют собой половые органы особей женского пола млекопитающих, расположенные между влагалищем и фаллопиевыми трубами включительно. Указанные репродуктивные органы по настоящему изобретению представляют собой матку, фаллопиевы трубы (включая маточно-трубное соустье), яичники, шейку матки и влагалище, предпочтительно матку, фаллопиевы трубы и шейку матки, более предпочтительно матку млекопитающего. Следовательно, гинекологическое нарушение по настоящему изобретению представляет собой заболевание, которое поражает по меньшей мере одну клетку половых путей особей женского пола млекопитающих, расположенных между влагалищем и фаллопиевыми трубами, преимущественно матки, фаллопиевых труб и шейки матки. В настоящем изобретении гинекологическое нарушение более предпочтительно представляет собой заболевание, которое поражает по меньшей мере одну клетку в ткани матки млекопитающего. В наиболее предпочтительном варианте осуществления гинекологическое нарушение выбрано из эндометриоза или лейомиомы.

В настоящем изобретении млекопитающее предпочтительно относится к гомининам, бычьим, лошадиным, собачьим, кошачьим, овечьим, свиным, верблюжьим, козьим или оленьим. Более предпочтительно указанное млекопитающее является человеком, собакой, коровой, лошадью или верблюдом, еще более предпочтительно человеком или собакой и наиболее предпочтительно человеком.

Таким образом, составы на основе ВО-11X могут представлять комбинацию компонентов и других физико-химических характеристик, которые обеспечивают эффекты, представляющие медицинский ин-

терес (как, например, для лечения таких видов рака, как меланома или виды карциномы), и их предпочтительно можно получать путем применения способа, совместимого с регуляторными и промышленными требованиями, такими, которые применимы для получения лекарственных средств. В частности, стадии получения ВО-11Х выполняют в строгом соответствии с требованиями Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств, действующими в Европе (конкретно приложение 13), США, Японии и/или других странах, и/или с требованиями для одобрения Досье исследуемого лекарственного средства (IMPD). Составы на основе ВО-11Х должны проходить испытания на стерильность, чистоту, стабильность и биологическую безопасность (отсутствие или практически отсутствие эндотоксинов, вируса, бактерий, химических веществ, металлов или других загрязняющих веществ, которые несовместимы с применением у людей). Например, уровень эндотоксинов не должен составлять более 1,0 EU/мг или 1 мкг/мл с использованием официально одобренных наборов для выявления.

Такие компоненты и характеристики, дополнительно характеризующие составы на основе ВО-11Х (в виде композиции или частиц, которые содержатся в ней), могут представлять собой одно или более из следующих:

(i) композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество с какими-либо дополнительными органическим соединением (таким как растворитель), неорганическим соединением, нуклеиновой кислотой, аптамером, пептидом или белком, представляющими медицинский интерес, или без них, которые включаются в состав самих частиц (например, во время их получения) или добавляются позже в композицию, содержащую данные частицы;

(ii) частицы, образованные за счет полиалкиленимина (такого как линейный PEI), в частности, характеризующегося средневесовой молекулярной массой, составляющей от 17 до 23 кДа, более предпочтительно от 17,5 до 22,6 кДа;

(iii) композицию, содержащую частицы, сформированные путем образования комплекса с использованием двухнитевых полирибонуклеотидов при концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 мг/мл от общего (т.е. конечного) объема указанной композиции (например, от 0,5 до 0,7 мг/мл, 0,9 мг/мл, 2 мг/мл или больше);

(iv) частицы, содержащие полиалкиленимин и двухнитевые полирибонуклеотиды, которые образованы при соотношении количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида (т.е. при соотношении количества молей азота указанного полиалкиленимина и количества молей фосфора указанного двухнитевого полирибонуклеотида, применяемых в образовании указанных частиц), равном или составляющем более 2,5, более предпочтительно от 2,5 до 5,5, еще более предпочтительно от 2,5 до 4,5, наиболее предпочтительно от 2,5 до 3,5;

(v) частицы, характеризующиеся мономодальным распределением по диаметру, с z-средним диаметром, определенным в настоящем документе и измеренным согласно ISO 22412, предпочтительно менее 200 нм, более предпочтительно менее 150 нм и еще более предпочтительно в диапазонах, составляющих от 150 до 30 нм (как, например, от 150 до 50 нм, от 150 до 75 нм, от 100 до 50 нм, от 150 до 100 нм или от 60 до 130 нм);

(vi) частицы, характеризующиеся мономодальным распределением по диаметру, определенным из распределения по диаметру согласно ISO 22412, которое представлено D-значениями D50% (максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 50%, также известный как медианный диаметр), составляющим от 75 до 150 нм, и D90% (максимальный диаметр частиц, меньше которого интенсивность образца падает на 90%), составляющим от 140 до 250 нм;

(vii) по меньшей мере 95% частиц характеризуются диаметром, составляющим 600 нм, предпочтительно диаметром, составляющим 500 нм, более предпочтительно диаметром, составляющим 400 нм, и еще более предпочтительно диаметром, составляющим 300 нм; еще более предпочтительно по меньшей мере 90% частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 300 нм;

(viii) композицию, характеризующуюся осмолярностью, составляющей от 200 до 600 мОсм/кг, предпочтительно водную композицию, содержащую 5% (вес./об.) глюкозы, характеризующуюся осмолярностью, составляющей от 200 до 400 мОсм/кг, более предпочтительно от 260 до 340 мОсм/кг;

(ix) композицию, характеризующуюся pH, составляющим от 2,7 до 3,4;

(x) водную композицию, содержащую 5% (вес./об.) D-глюкозы, что характеризуется удельным оптическим вращением, составляющим от +1500 до +3750° мл·г⁻¹·дм⁻¹ при длине волны 589 нм при 20°C, в воде, рассчитанным относительно воды; и/или

(xi) композицию, характеризующуюся дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, как, например, 38 мВ, предпочтительно составляющим от 35 до 50 мВ или более предпочтительно составляющим от приблизительно 40 до 45 мВ (например, 43 мВ), определенным в настоящем документе и измеренным согласно ISO 13099.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение может относиться к композициям, в частности, для фармацевтического применения, содержащим частицы, где указанные частицы содержат комплексы из двухнитевых полинуклеотидов и водорастворимого поликатионного гомо- или гетерополимера, при этом указанные частицы характеризуются мономодальным распределением по диаметру, которое определяется наличием диаметра, составляющего менее или равного 600 нм, предпочти-

тельно менее или равного 300 нм, и z-среднего диаметра, составляющего менее или равного 200 нм, предпочтительно менее или равного 150 нм.

В другом предпочтительном варианте осуществления двухнитевые полирибонуклеотиды представляют собой молекулы poly(I:C), которые присутствуют в составах на основе ВО-11Х и получены в результате гибридизации молекул полиинозиновой кислоты [poly(I)] и одноцепочечных молекул полицитидиловой кислоты [poly(C)], которые в свою очередь характеризуются конкретными диапазонами процентных долей в отношении размеров, а именно меньше 0,4 т.о., от 0,4 до 0,85 т.о., от 0,85 до 5,0 т.о. и больше 5,0 т.о., как отмечено в примерах, которые также предусматривают способы получения водного раствора молекул poly(I:C) (уже содержащего наполнитель, такой как глюкоза или маннит, или нет), и обладают соответствующими характеристиками для смешивания с водным раствором полиалкиленимина (такого как полиэтиленмин) для получения составов на основе ВО-11Х. Poly(I:C)-содержащий состав, полученный в результате смешивания этих двух водных растворов, затем хранят в виде партии препарата (предпочтительно все еще в виде водного раствора или в лиофилизированной форме), или его можно непосредственно получать в аликвотах, каждая из которых содержится во флаконах для однократного применения, шприцах или другом подходящем контейнере для хранения, однократного применения таких аликвот и/или лиофилизации. Составы на основе ВО-11Х (в жидкой или лиофилизированной форме) можно хранить при комнатной температуре или при температуре ниже 0°C или ниже -20°C.

В таких предпочтительных вариантах осуществления дополнительные соединения (такие как один или более из антитела, гормона, пептида, наполнителя, носителя, ингибитора ферментной активности, химиотерапевтического средства, антибиотика, стабилизатора, средства для мечения, органического растворителя, консервантов, носителей или других лекарственных средств) можно добавлять либо в каждый из двух водных растворов (если это не изменит правильное образование частиц или какую-либо другую из характеристик, перечисленных выше для составов на основе ВО-11Х) перед их смешиванием, либо после того, как получили состав на основе ВО-11Х смешиванием двух водных растворов (двухнитевого полирибонуклеотида и полиалкиленимина). Такие дополнительные компоненты, которые, следовательно, вводят в одно и то же время с компонентами ВО-11Х, могут обеспечивать улучшения композиции в отношении биологической доступности, эффективности, фармакокинетического/фармакодинамического профилей, стабильности, метаболизма или другого свойства, представляющего фармацевтический интерес, которые не наблюдаются, если каждый из исходного состава на основе ВО-11Х или дополнительного компонента (например, другое соединение, представляющее фармацевтический интерес) вводят по отдельности или каждый из исходного состава на основе ВО-11Х или дополнительного компонента вводят отдельно.

В дополнительном предпочтительном основном варианте осуществления состав на основе ВО-11Х предназначен для применения в качестве лекарственного препарата, такого как фармацевтическая композиция, которую составляют (например, в виде инъекционной водной композиции, необязательно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество) и вводят для доставки двухнитевых полирибонуклеотидов в орган или ткань в здоровом состоянии, проявляющих заболевание, связанное с экзогенным возбудителем заболевания (таким как бактерия или вирус), или проявляющих альтерацию по причине нарушения клеточного роста, характеризующегося аномальным ростом клеток человека или животного, например, по причине рака (т.е. что включает вызывающую опухоли трансформацию, метастазирование, токсичное соединение), или гинекологического нарушения, характеризующегося аномальным ростом клеток репродуктивных органов особей женского пола млекопитающих). Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение композиции по настоящему изобретению человеку или животному. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения клеточного роста, характеризующегося аномальным ростом клеток человека или животного, как определено в настоящем документе, включающему введение композиции по настоящему изобретению человеку или животному.

Предпочтительно состав на основе ВО-11Х применяют в способах индуцирования (прямо или опосредованно) гибели опухолевой клетки или супрессии роста опухолевой клетки в рамках лечения, сокращения, уменьшения интенсивности или предупреждения роста раковой опухоли, метастазирования, эпителиально-мезенхимального перехода, ускользания от иммунного ответа или рецидива, обеспечения выживаемости. Более предпочтительно составы на основе ВО-11Х применяют в способах лечения солидных опухолей, таких как карциномы, глиомы, меланомы или саркомы. В частности, состав на основе ВО-11Х вводят либо системно, либо более непосредственно в опухоль или в место около опухоли, такое как край опухолевой массы, окружающие эпителиальные клетки, лимфатические или кровеносные сосуды (например, с помощью интратуморальной или перитуморальной инъекции) или аномально растущие клетки репродуктивных органов особей женского пола млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11Х представляет собой состав, полученный согласно способам получения и затем структурно и функционально определенный, как описано в примерах, как состав на основе ВО-111 или состав на основе ВО-112. Состав на основе ВО-11Х может дополнительно характеризоваться видами биологической активности, которые охарактеризованы в от-

ношении BO-110, как описано в WO 2011003883, а именно активацией семейства хеликаз MDA-5 или уровнем экспрессии NOXA, в комбинации с индуцированием аутофагии в раковых клетках или в клеточной линии, полученной из раковых клеток, предпочтительно человеческого происхождения, но при этом в повышенной степени. Примеры клеточных линий для проверки составов на основе BO-11X представляют собой клетки человека SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 и SK-Mel-147 и мышинные клетки B16, при этом указанные клеточные линии меланомы проявляют повышенную экспрессию молекул, таких как интерферон бета, при воздействии состава на основе BO-11X. Дополнительно состав на основе BO-11X не проявляет токсичности в отношении нормальных клеток, используемых как контроля, таких как меланоциты или другие клетки кожи, а также клетки иммунной системы, которые обычно представляют собой сайты вторичной токсичности при лечении рака. Состав на основе BO-11X также может после аутофагии и апоптоза раковых клеток (или какого-либо другого эффекта, представляющего терапевтический интерес, который данный состав может индуцировать в таких клетках) индуцировать высвобождение антигенов раковых клеток, которые могут действовать в качестве индукторов специфичного в отношении опухолей иммунного ответа, в частности, если состав на основе BO-11X вводят местно по отношению к раковым клеткам или опухолям (например, с помощью перитуморальной или интратуморальной инъекции, введения BO-11X на край опухолевой массы, в окружающие эпителиальные клетки, лимфатические или кровеносные сосуды или непосредственно в опухолевую массу) с одновременным или последовательным введением другого лекарственного средства или применением иного лечения для того же показания, или без них.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции, раскрытой в настоящем документе, который включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;

(ii) фильтрование независимо каждого раствора через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 500 нм, с образованием стерилизованных растворов;

(iii) смешивание полученных стерилизованных растворов в смесительной камере с образованием водной композиции путем добавления одного из указанных растворов в другой раствор в указанной смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин, или путем одновременного добавления каждого из указанных растворов в указанную смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин; и необязательно

(iv) фильтрование полученной водной композиции через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 600 нм, с образованием фильтрата или центрифугирование полученной водной композиции при ускорении, составляющем более или равном 22480 м/с^2 , с образованием надосадочной жидкости; и/или

(v) лиофилизацию полученных водной композиции, фильтрата или надосадочной жидкости.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение может относиться к способу получения композиции, раскрытой в настоящем документе, который включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;

(ii) фильтрование независимо каждого раствора через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 500 нм, с образованием стерилизованных растворов; и

(iii) смешивание полученных стерилизованных растворов в смесительной камере с образованием водной композиции путем добавления одного из указанных растворов в другой раствор в указанной смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин, или путем одновременного добавления каждого из указанных растворов в указанную смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин; и

(iv) необязательно лиофилизацию полученной водной композиции.

Дополнительно в другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение может относиться к способу получения композиции, раскрытой в настоящем документе, который включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;

(ii) фильтрование независимо каждого раствора через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 500 нм, с образованием стерилизованных растворов;

(iii) смешивание полученных стерилизованных растворов в смесительной камере с образованием

водной композиции путем добавления одного из указанных растворов в другой раствор в указанной смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин, или путем одновременного добавления каждого из указанных растворов в указанную смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин; и

(iv) фильтрование полученной водной композиции через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 600 нм, с образованием фильтрата или центрифугирование полученной водной композиции при ускорении, составляющем более или равном 22480 м/с^2 , с образованием надосадочной жидкости; и

(v) необязательно лиофилизацию полученных фильтрата или надосадочной жидкости.

Более предпочтительно способ по настоящему изобретению не включает конечной стадии лиофилизации. В способе по настоящему изобретению указанный двухнитевой полирибонуклеотид, указанный полиалкиленимин и указанные фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество являются такими, как раскрыто в настоящем документе. Стерилизация каждого раствора с образованием стерилизованных растворов происходит с помощью фильтрования указанных растворов независимо через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 500 нм, предпочтительно фильтрования указанных растворов независимо через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 300 нм, более предпочтительно фильтрования указанных растворов через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 200 нм. Предпочтительно смешивание полученных фильтратов происходит посредством крупномасштабной конвекционной передачи вихрей и впоследствии посредством устранения различий концентрации с помощью исключительно диффузной передачи. Смесительная камера может представлять собой любую камеру или сосуд, в которых начинается перемешивание указанных растворов, такие как колба, реактор или смеситель. Более предпочтительно указанная смесительная камера имеет фиксированный объем от 0,1 до 20 мл, более предпочтительно от 0,2 до 10 мл, еще более предпочтительно от 0,5 до 8 мл. Более предпочтительно смешивание происходит путем добавления, необязательно путем впрыскивания, при скорости от 1 до 2000 мл/мин, более предпочтительно от 10 до 1000 мл/мин, еще более предпочтительно от 20 до 500 мл/мин. Необязательное фильтрование полученной водной композиции с образованием или сбором фильтрата можно впоследствии выполнять через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 600 нм, предпочтительно не превышающим диаметр 500 нм, более предпочтительно не превышающим диаметр 400 нм, еще более предпочтительно не превышающим диаметр 300 нм. Альтернативно необязательное центрифугирование полученной водной композиции с образованием или сбором надосадочной жидкости можно впоследствии выполнять при более чем 22480 м/с^2 (5000 rpm на роторе с радиусом, составляющим 0,082 м), предпочтительно при более чем 27202 м/с^2 (5500 rpm на роторе с радиусом, составляющим 0,082 м), более предпочтительно при более чем 32372 м/с^2 (6000 rpm на роторе с радиусом, составляющим 0,082 м), еще более предпочтительно 44062 м/с^2 (7000 rpm на роторе с радиусом, составляющим 0,082 м). В одном особенно предпочтительном варианте осуществления стадия (iv) является обязательной, если получение композиции по настоящему изобретению не достигается посредством стадий (i)-(iii) способа по настоящему изобретению, а именно, если добавление проводят при такой норме, что менее 95% частиц, содержащихся в указанной водной композиции, характеризуются диаметром, составляющим менее или равным 600 нм; и/или указанные частицы характеризуются z-средним диаметром, составляющим более 200 нм, более предпочтительно, если указанные частицы не характеризуются мономодальным распределением по диаметру. Это может происходить в случае, если добавление выполняют при скорости, составляющей от 1 до 20 мл/мин, в частности, в реакционной камере объемом от 0,5 до 20 мл. Наконец, полученные водную композицию, фильтрат или надосадочную жидкость можно подвергать лиофилизации с обеспечением композиции по настоящему изобретению в виде твердого вещества в форме частиц.

Таким образом, в одном особенно предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению указанный способ включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;

(ii) фильтрование независимо каждого раствора через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 200 нм, с образованием стерилизованных растворов;

(iii) смешивание полученных стерилизованных растворов в смесительной камере с образованием водной композиции путем добавления одного из указанных растворов в другой раствор в указанной смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей от 20 до 100 мл/мин, или путем одновременного добавления каждого из указанных растворов в указанную смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей от 20 до 100 мл/мин, где указанная смесительная камера имеет объем от 0,2 до 10 мл;

(iv) фильтрование полученной водной композиции через фильтр с диаметром пор, составляющим

менее или равным 500 нм, с образованием фильтрата или центрифугирование полученной водной композиции при ускорении, составляющем более или равном 32372 м/с^2 (6000 gpm на роторе с радиусом, составляющим 0,082 м) с образованием надосадочной жидкости; и

(v) необязательно лиофилизацию полученного фильтрата или надосадочной жидкости.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления способа по настоящему изобретению указанный способ включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;

(ii) фильтрование независимо каждого раствора через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 200 нм, с образованием стерилизованных растворов;

(iii) смешивание полученных стерилизованных растворов в смесительной камере с образованием водной композиции путем добавления одного из указанных растворов в другой раствор в указанной смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей от 30 до 100 мл/мин, или путем одновременного добавления каждого из указанных растворов в указанную смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей от 30 до 100 мл/мин, где указанная смесительная камера имеет объем от 0,5 до 8 мл; и

(vi) необязательно лиофилизацию полученной водной композиции.

В дополнительном варианте осуществления состав на основе ВО-11Х производят в соответствии со способом получения, который включает смешивание двух водных растворов, первого раствора, содержащего двухнитевые полирибонуклеотиды (или их соль или сольват), и второго раствора, содержащего полиалкиленимин (или его соль или сольват), таким образом, что полученные частицы проявляют характеристики, определенные выше, в частности, в отношении диаметра и мономодального распределения по диаметру, а также принимают вид фактически прозрачного коллоидного раствора.

Как описано более подробно в примерах, составы на основе ВО-11Х можно обеспечивать с помощью фильтрования и/или центрифугирования фармацевтической композиции, содержащей частицы, образованные с помощью двухнитевых полирибонуклеотидов и водорастворимого поликатионного гомо- или гетерополимера, обеспечивая составы на основе ВО-11Х в виде нерасфасованных жидких композиций или жидких композиций для однократного применения без видимых агрегатов. Такой способ получения композиции включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата необязательно вместе с фармацевтически приемлемым носителем, органическим растворителем, наполнителем и/или вспомогательным веществом, присутствующими в любом растворе;

(ii) смешивание указанных растворов и

(iii) фильтрование полученной смеси через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 600 нм, или центрифугирование при более чем 22480 м/с^2 .

Данный способ можно дополнительно адаптировать для фактически имеющихся компонентов композиции (двухнитевые полирибонуклеотиды, полиалкиленимин и необязательные дополнительные компоненты), а также для желательных способов применения, хранения, перевозки, упаковки и/или введения композиции, в частности, если композицию необходимо получить непосредственно перед применением или, что является более распространенным для фармацевтических композиций, композицию необходимо получить для длительного хранения и/или в форме нескольких контейнеров, каждый из которых предназначен для однократного применения (например, в стерильных флаконах или шприцах), и содержащей частицы, характеризующиеся наиболее равномерным размером, содержанием poly(I:C), стабильностью, растворимостью и, наконец, биологическими эффектами при введении.

Для этой цели вышеизложенные стадии смешивания и фильтрования (ii) и (iii) можно адаптировать на уровне обеспечения фильтрования и/или смешивания, способа смешивания, скорости смешивания и/или количества растворов, которое смешивают. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления способ получения составов на основе ВО-11Х включает:

(i) получение водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и водного раствора по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли или сольвата необязательно вместе с фармацевтически приемлемым носителем, органическим растворителем, наполнителем и/или вспомогательным веществом, присутствующими в любом растворе;

(ii) стерилизацию каждого раствора с помощью их фильтрования независимо;

(iii) смешивание указанных растворов в контейнере для хранения, лиофилизации и/или применения композиции путем добавления любого раствора первым, а затем второго раствора при скорости инъекции, превышающей 50 gpm, при скорости потока, составляющей от 1 до 50 мл/мин; и

(iv) герметичное укупоривание контейнера.

Комбинации.

Композицию в соответствии с настоящим изобретением можно применять в комбинациях, в том

числе с другими соединениями или схемами лечения, с которыми, как известно, она совместима, если при этом не обеспечивается суммарный или даже синергетический эффект. Например, молекулы poly(I:C) можно применять в комбинации с различными противораковыми лекарственными средствами, антителами, лучевой терапией или химиотерапией (Le U. et al., 2008; Le U. et al., 2009; Taura M. et al., 2010; Matijevic T. et al., 2011; Levitzki A., 2012; Yoshino H and Kashiwakura I., 2013; Hafher A. et al., 2013) или молекулами poly(I:C) разной длины (Zhou Y. et al., 2013). Молекулы poly(I:C) также применяли в качестве вспомогательного вещества или синергетически действующего средства при объединении с другими средствами, как, например, при вакцинации раковыми антигенами или клеточными лизатами (Ammi R. et al., 2015), средствами, блокирующими путь PD-1/PD-L1 (Nagato T. and Celis E., 2014), другими агонистами TLR, такими как агонист TLR9 CpG ODN (Zhang Y. et al., 2014), дихлорацетатом (Ohashi T. et al., 2013), IL27 (Chiba Y. et al., 2013), ингибиторами киназы, такими как сорафениб (Ho V. et al., 2015), проапоптозными белками, такими как NS1 (Gupta S. et al. 2016), золедроновой кислотой (Chen L. et al., 2013) или политрансретиновой кислотой (Szabo A. et al., 2012). Другие применения составов на основе BO-11X могут быть очевидными с учетом ранее продемонстрированных видов активности молекул poly(I:C) в отношении конкретных типов клеток, по меньшей мере, с применением анализов *in vitro*, как, например, на преадипоцитах, ингибирование дифференцировки адипоцитов (Yu L. et al., 2016), на мезенхимальных стволовых клетках, повышение иммуносупрессорных эффектов (Cho K. et al., 2016; Vega-Letter A. et al., 2016) или активация NK-клеток (Perrot I. et al., 2010).

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество состава на основе BO-11X и эффективное количество одного или более иммуномодулирующих средств, в частности средств, которые нацеливаются на молекулы иммунных контрольных точек (такие как PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD134, CD134L, CD137, CD137L, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7RP1, LAG3, ICOS, TIM3, GAL9, CD28, AP2M1, SHP-2, PPP2R5A или OX-40), при этом указанные соединения обычно называют ингибиторами контрольных точек (CPI).

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает композиции и способы, которые являются приемлемыми в комбинированных видах терапии и схемах лечения, включающих введение составов на основе BO-11X и другого терапевтического средства или лечения (в том числе лучевой терапии, химиотерапии, криотерапии, абляции опухоли или фотодинамической терапии). В частности, настоящее изобретение относится к способу лечения, облегчения или предупреждения роста раковой опухоли, метастазирования, образования язвы, ускользания от иммунного ответа или рецидива у субъекта, включающему введение состава на основе BO-11X и одного или более противораковых лекарственных средств, предпочтительно иммуномодулирующего средства, где введение является одновременным (в виде отдельных составов или в контексте совместного составления) или последовательным (в любом порядке или в последовательных циклах введения). В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение эффективного количества средства на основе состава на основе BO-11X и эффективного количества одного или более иммуномодулирующих средств субъекту, нуждающемуся в этом, в частности, где субъект проходит терапию рака с помощью одного или более иммуномодулирующих средств.

В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство предпочтительно представляет собой антитело, в том числе моноклональное антитело и другие форматы антител, или какое-либо другое фармацевтически доступное средство, которое связывает белок клеточной поверхности, который контролирует иммунный ответ, таким образом действуя как CPI. Данный CPI может блокировать, сокращать и/или ингибировать PD-1 и PD-L1 или PD-L2, и/или связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2. Альтернативно данный CPI может блокировать, уменьшать и/или ингибировать активность других молекул иммунных контрольных точек, таких как CTLA-4, AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 и/или PPP2R5A. В качестве дополнительной альтернативы CPI усиливает и/или стимулирует CD137 (4-1BB) и/или связывание CD137 (4-1BB) с одним или более из лиганда 4-1BB и TRAF2.

В различных вариантах осуществления способы, подразумевающие комбинированные виды терапии и схемы лечения для лечения рака, включающие введение составов на основе BO-11, можно дополнительно определять относительно конкретного способа введения, где состав на основе BO-11X вводят путем, отличным от пути введения другого терапевтического соединения, такого как иммуномодулирующие средства и предпочтительно CPI. Данный способ может включать введение состава на основе BO-11X с помощью интратуморальной или перитуморальной инъекции (в опухоль, край опухолевой массы, окружающие эпителиальные клетки, лимфатические или кровеносные сосуды) или других способов, которые обеспечивают введение состава на основе BO-11X непосредственно или вблизи от раковых клеток или органа, содержащего раковые клетки (и опосредованно, например, через кровеносную систему), и системное введение CPI или другого иммуностимулирующего средства). Интратуморальную или перитуморальную инъекцию состава на основе BO-11X можно осуществлять на уровне кожи, т.е. в кожу (например, для лечения меланомы или в связи с комбинацией с вакциной), или во внутренний орган, или в ткань, т.е. в указанный внутренний орган или в ткань (например, с помощью интрагепатической инъекции для лечения рака печени или интравезикулярного введения при раке мочевого пузыря). Такое местное введение состава на основе BO-11X предпочтительно следует за введением иммуностимулирующего

средства или (предпочтительно) осуществляется перед ним.

Дополнительные эффекты и применения.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтические применения и способы, включающие введение состава на основе ВО-11Х для увеличения иммунного ответа на патоген или нежелательное биологическое средство и, в частности, для усиления противоопухолевого иммунного ответа, потенциально действующего самого по себе в качестве иммуномодулирующего средства. Такой эффект можно контролировать путем измерения связанного с опухолью иммунного ответа в месте опухоли и микроокружении опухоли (или в кровеносном русле, других биологических текучих средах и тканях) по уровню релевантных типов клеток или субпопуляций (например, дендритных клеток, Т-регуляторных клеток, Т-клеток и/или НК-клеток) и/или иммунологических биологических маркеров (например, хемокинов, факторов роста, цитокинов и их рецепторов).

Фармацевтические композиции.

Также предусмотрены способы получения фармацевтической композиции ВО-111 или ВО-112 (и/или других составов на основе ВО-11Х) путем смешивания состава на основе ВО-11Х и одного или более из его фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, разбавителя, носителя или наполнителя. Такие компоненты можно адаптировать для конкретного медицинского показания (например, солидного рака или гематологического рака) и/или способов введения, например, с помощью инъекции (перитуморальной, интратуморальной, интрагепатической, интрапанкреатической или подкожной инъекции), ингаляции или перорально.

Комбинированные виды лечения с помощью состава на основе ВО-11Х могут подразумевать один и тот же или различные пути введения состава на основе ВО-11Х и другого соединения. В частности, состав на основе ВО-11Х можно вводить, как и в случае других иммуностимулирующих РНК-средств, посредством интратуморальной или перитуморальной инъекций, которые могут активировать иммунную систему до системного введения терапевтического антитела, действующего в качестве CPI, такого как ингибиторы сигнального пути PD-1/PD-L1 (Bald T. et al., 2014) или активированные Т-клетки (Amos S.M. et al., 2011). Альтернативно подразумевается состав на основе ВО-11Х вместе с другими терапевтическими соединениями, являющимися агонистом или лигандами TLR, такими как молекулы CpG или резиквимод, для усиления эффекта противораковой вакцинации (Sajadian A. et al., 2014) или дендритных клеток (Fujimura T. et al., 2006).

Иммуномодулирующие средства.

Состав на основе ВО-11Х можно объединять с одним или более иммуномодулирующих средств. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой совместно стимулирующую или совместно ингибирующую молекулу (например, одну или более иммунных клеток, таких как без ограничения Т-клетки и НК-клетки). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой средство, которое модулирует CD4 и/или CD8 Т-клетку, например, действуя в качестве агониста или антагониста в отношении CD3, CD4, CD8, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD137, CD96, CD73, CD90, CD47, CD69, CD26, TIM3 и LAG3. В других вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой средство, которое модулирует НК-клетки, например, действуя в качестве агониста или антагониста в отношении CD3, NKp46, CD16, NKG2D, NKp44 и NKp30. В других вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой средство, которое модулирует опухолевую строму и биологические маркеры эндотелия, например, действуя в качестве агониста или антагониста в отношении CD45, PD-L1, PD-L2, PTEN и CD31.

Иммуномодулирующее средство предусматривают в качестве дополнительного соединения в форме химического органического или неорганического соединения, нуклеиновой кислоты, аптамера, пептида, белка и более конкретно антитела, которое связывает релевантную мишень в биологических текучих средах или на поверхности клетки. Антитело может быть поликлональным или моноклональным; интактным или усеченным (например, F(ab')₂, Fab, Fv); биспецифичным или мультиспецифичным; ксеногенным, аллогенным, сингенным или их модифицированными формами (например, химерное антитело или гуманизированное антитело). Если иммуномодулирующее средство является моноклональным антителом, оно может представлять собой моноклональное антитело, полученное от млекопитающего, отличного от человека, рекомбинантное химерное моноклональное антитело, рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело или моноклональное человеческое антитело.

Антитело, которое действует в качестве иммуномодулирующего средства, может дополнительно содержать структурные элементы, обычно требующиеся для оказания требуемой биологической активности, такие как четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, которые способны связывать один или более антигенов (например, биспецифичные или мультиспецифичные антитела) и представлять Fc-область иммуноглобулина (например, IgA, IgG, IgE, IgD или IgM), которая может взаимодействовать с рецепторами Fc и активировать иммунный ответ, что приводит к истощению и/или клеточной гибели иммунных клеток или других клеток. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH₁, CH₂ и CH₃. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи. Кон-

стантная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V_H и V_L можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующимися с областями, которые более консервативны, называемыми каркасными областями (FR). Каждая вариабельная область (V_H или V_L) содержит 3 CDR, обозначенные CDR1, CDR2 и CDR3. Каждая вариабельная область также содержит 4 каркасные подобласти, обозначенные FR1, FR2, FR3 и FR4. Термин антитело включает все типы антител, в том числе, например, IgA, IgG, IgD, IgE и IgM, и их соответствующие подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; IgA1 и IgA2. Антитело в некоторых вариантах осуществления также относится к фрагментам антитела и антигенсвязывающим фрагментам.

Антитела, подходящие для осуществления способов, описанных в настоящем документе, могут относиться к различным форматам антител, например моноклональное, поликлональное, биспецифичное, мультиспецифичное, и могут включать без ограничения человеческие, гуманизированные или химерные антитела, предусматривающие одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, полученные путем экспрессии библиотеки Fab, и/или связывающие фрагменты любого из вышеуказанных антител. Антитела также относятся к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. молекулам, которые содержат по меньшей мере два антигена или сайта связывания мишени против по меньшей мере двух мишеней, описанных в настоящем документе. Молекулы иммуноглобулинов, описанные в настоящем документе, могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. В дополнение антитела (например, моно-, би- и/или мультиспецифичные), подходящие для осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе, можно предусматривать в любом из альтернативных форматов, которые раскрыты в литературе, например диатела, молекулы Flexibody; верблужьи антитела, молекулы Immunobody; Triomab, пептитела, молекулы Vaccibody, миниантитела, Fcab, молекулы UniBody или UniBody (Storz U 2011).

PD-1 (также известный как CD279 или белок программируемой клеточной гибели 1) является членом семейства B7 рецепторов. В некоторых вариантах осуществления PD-1 относится к последовательности PD-1 человека (см., например, эталонную последовательность NCBI: NP005009) и любым встречающимся в природе аллельным вариантам, сплайс-вариантам и их обработанным формам (Keir M. et al., 2008; UniProt: Q15116). PD-1 связывает PD-L1 (также известный как CD274 или B7-H1) и PD-L2 (также известный как CD273 или B7-DC), которые также являются членами семейства B7. В некоторых вариантах осуществления PD-L1 относится к PD-L1 человека (см., например, GenBank: AF233516), PD-L2 относится к PD-L2 человека (например, эталонная последовательность NCBI: NM_025239) вместе с любыми встречающимися в природе аллельными вариантами, сплайс-вариантами и их обработанными формами.

В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство нацеливается на один или более из PD-1, PD-L1 и PD-L2. В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой ингибитор PD-1. В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, специфичное к одному или более из PD-1, PD-L1 и PD-L2. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, такое как без ограничения ниволумаб, (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO), пембролизумаб (KEYTRUDA), пидилизумаб (CT-011), MK-3475, BMS 936559, MPDL3280A.

В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из BMS-936559 и MEDI4736 для лечения, например, солидной опухоли на поздней стадии. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из MPDL3280A (необязательно с вемурафенибом) и MEDI4736 (необязательно с одним или более из дабрафениба и траметиниба) для лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из MPDL3280A (необязательно с эрлотинибом) и MEDI4736 (необязательно с тремелимумабом) для лечения NSCLC. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с MPDL3280A (необязательно с одним или более из бевацизумаба и сунитиниба) для лечения RCC. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с MPDL3280A для лечения солидных или гематологических злокачественных опухолей. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из MPDL3280A (необязательно с одним или более из бевацизумаба, химиотерапии и кобиметиниба), MEDI4736 (необязательно с тремелимумабом) и MSB0010718C для лечения солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с AMP-224 для лечения рака на поздней стадии. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с ниволумабом (необязательно с илиолумбаром (анти-KIR)) для лечения солидных опухолей на поздней стадии. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с ниволумабом для лечения устойчивого к кастрации рака предстательной железы, меланомы, NSCLC и RCC. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пембролизумабом для лечения рака толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пембролизумабом для лечения рака желудка, рака головы и шеи, TNBC и уротелиального рака. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с ниволумабом (необязательно с ипилимумабом) для лечения рака желудка, рака

поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого и TNBC. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с ниволумабом (необязательно с ипилимумабом) для лечения глиобластомы. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с ниволумабом для лечения гепатоцеллюлярного рака. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пембролизумабом для лечения лимфомы Ходжкина, миеломы, миелодиспластического синдрома и неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пидилизумабом для лечения злокачественных глиом. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из ниволумаба (необязательно с одним или более из ипилимумаба, пептидов многочисленного класса 1 и монтанида ISA 51 VG; и необязательно последовательно с ипилимумабом) и пембролизумаба для лечения меланомы. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пембролизумабом для лечения меланомы и NSCI:C. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из ниволумаба (необязательно с одним или более из гемцитабина/цисплатина, пеметрекседа/цисплатина, карбоплатина/паклитаксела, бевацизумаба, эрлотиниба и ипилимумаба) и пембролизумаба для лечения NSCI:C. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пидилизумабом (необязательно с гемцитабином) для лечения рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пидилизумабом (необязательно с одним или более из сипулейцела-Т и циклофосфида) для лечения рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из ниволумаба (необязательно с одним или более из сунитиниба, пазопаниба и ипилимумаба), пембролизумаба (необязательно с пазопанибом) и пидилизумаба (необязательно с вакциной на основе клеток RCC, слитых с дендритными клетками) для лечения RCC. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с одним или более из антитела к LAG3 (BMS-986016, необязательно с ниволумабом), ниволумаба (необязательно с интерлейкином-21) и AMP-554 для лечения солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с пембролизумабом для лечения солидных опухолей.

В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство нацеливается на один или более из CD137 или CD137L. В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, специфичное к одному или более из CD137 или CD137L. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, такое как без ограничения урелумаб (также известный как BMS-663513 и антитело к 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с урелумабом (необязательно с одним или более из ниволумаба, лирилумаба и урелумаба) для лечения солидных опухолей, и/или В-клеточной неходжкинской лимфомы, и/или рака головы и шеи, и/или множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, такое как без ограничения ипилимумаб (MDX-010, MDX-101, Yervoy, BMS) и/или тремелиумаб (Pfizer). В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X объединяют с ипилимумабом (необязательно с бавитуксимабом) для лечения одного или более из меланомы, рака предстательной железы и рака легкого.

В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство нацеливается на CD20. В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, специфичное к CD20. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело, такое как без ограничения офатумаб, обинутузумаб (GAZYVA), AME-133v, окрелизумаб, TRU-015 и велтузумаб.

Проверка составов на основе BO-11X.

Доклиническую проверку терапевтической эффективности состава на основе BO-11X (в соответствии с настоящим изобретением и как проиллюстрировано с помощью BO-111 и BO-112 в примерах) можно выполнять в ходе клеточных анализов и, что более интересно, на животных моделях, где можно исследовать и сравнивать разные экспериментальные критерии для установления наиболее подходящих условий для достижения эффективных терапевтических эффектов, с использованием состава на основе BO-11X отдельно или в комбинации с кандидатным или одобренным противораковым лекарственным средством. Данные критерии включают дозы, путь введения, порядок и/или частоту введения любого из соединений с целью определить, какие условия являются лучшими для терапевтического применения состава на основе BO-11X (отдельно или синергетически с кандидатным или одобренным противораковым лекарственным средством) касательно эффективности, безопасности и/или клинического применения.

Влияние разной дозировки состава на основе BO-11X, числа введений и/или места введения (в частности, с помощью инъекции в одно или более мест), пути введения, частоты и/или временной точки для введения может быть связано с релевантными конечными точками и физиологическими параметрами, которые измеряют в биологических образцах, полученных из клеток или (предпочтительно) от животных, которых подвергают воздействию исследуемых соединений по отдельности или в комбинации с другими лекарственными средствами.

Неограничивающий список таких параметров включает регрессию размера опухоли, блокирование опухолевого роста и/или пролиферации опухолевых клеток, апоптоз, уменьшенное образование сосудов

в опухоли или метастазирование, преодоление устойчивости к обычному противораковому лекарственному средству (или, в противном случае, улучшение ответа на такое лекарственное средство в популяции, которую подвергают лечению), уменьшение связанных с лечением неблагоприятных явлений в нормальных тканях и отражающихся на функциях, модуляцию иммунного ответа и/или иммунных клеток, характеризующихся конкретными видами активности и характеристиками, идентификацию биологических маркеров или конкретных клеточных популяций в биологических материалах (например, присутствующих в препаратах раковых клеток, биопсиях опухолей или биологических текучих средах), увеличение (или снижение) которых, как известно из литературы, ассоциировано в целом с противораковым эффектом и, в частности, с выживаемостью животных моделей и возможно пациентов, страдающих раком. По мере возможности такие конечные точки измеряют в промежуточной и конечной временных точках после введения каждого исследуемого соединения или исследуемой комбинации соединений при данной дозе и/или схеме лечения с применением конкретных пути введения и/или фармацевтических составов.

Терапевтическую противораковую эффективность состава на основе ВО-11Х можно исследовать отдельно или в комбинации со стандартным лечением, традиционными видами лечения (такими как лучевая терапия, химиотерапия, ингибиторы клеточных киназ и т.д.) или видами лечения, подразумевающими новые механизмы и/или новые кандидатные противораковые лекарственные средства. В самом деле, категорией новых противораковых соединений, которые можно исследовать в комбинации с составом на основе ВО-11Х, являются те, которые улучшают противоопухолевые иммунные ответы в микроокружении опухоли посредством обеспечения системного противоопухолевого иммунитета, который нацеливается на диссеминированные опухолевые клетки, которые элиминируются. Доказано, что данный подход был успешен в животных моделях и у пациентов и может улучшать результаты традиционных видов терапии, таких как лучевая терапия или химиотерапия (см., например, Galluzzi L. et al., 2014; Vaccielli E. et al., 2013; Van der Jeught K. et al., 2015).

Данная увеличивающаяся панель новых лекарственных средств против рака нацеливается на механизмы, посредством которых раковые клетки ускользают от иммунного выявления и разрушения организмом человека. Специфичные в отношении рака виды иммунотерапии могут обеспечивать ряды преимуществ при сравнении с другими видами терапии рака (например, специфичность в отношении опухолевой клетки). Действительно, идентификация серий молекулярных мишеней для видов иммунотерапии рака предоставляет большие преимущества в определении механизмов и соединений, которые могут оказывать соответствующий совместно стимулирующий (или совместно ингибирующий) эффект на иммунные ответы против опухолей в отношении их пластичности, гетерогенности, устойчивости или микроокружения.

Неограничивающий список пассивных или активных видов иммунотерапии рака, каждый из которых действует на различные молекулярные мишени и/или механизмы, включает нацеливающиеся на опухоль или другие иммуномодуляторные моноклональные антитела, онколитические вирусы, иммуностимулирующие цитокины, адаптивный перенос клеток и другие виды терапии на основе клеток, вакцины на основе ДНК или пептидов, ингибиторы иммуносупрессивного метаболизма или агонисты паттерн-распознающих рецепторов. Среди данных механизмов молекулярные мишени, в отношении которых антитела или другие соединения обладают либо агонистической, либо антагонистической активностью (в зависимости от их роли в иммунном ответе или ускользании рака от иммунного ответа), включают серии белков клеточной мембраны, таких как PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD137, CD38, OX-40, CD26, TIM3 и LAG3, которые являются контрольными точками для развития опухоли и против которых разные агонистические или антагонистические антитела доступны коммерчески или в научно-исследовательских хранилищах для характеристики их специфичности и/или уровня противоракового эффекта против антигена человека или соответствующего антигена грызуна (при осуществлении с помощью животных моделей).

Несмотря на впечатляющие ответы у пациентов на средства, нацеливающиеся на данные совместно стимулирующие или совместно ингибирующие молекулы (например, виды терапии, которые основаны на использовании антитела к PD-1 или PD-L1), клинический ответ на ингибиторы иммунных контрольных точек является все еще не в полной мере достигающим или неэффективно достигающим необходимого терапевтического эффекта у слишком большого числа пациентов, страдающих раком. Состав на основе ВО-11Х в соответствующей комбинации с соединением, таким как антитело к PD-1 или к CD137, может усиливать уменьшение опухолевого роста и метастазирования (или увеличивать число субъектов, проявляющих такое уменьшение) по сравнению с эффектом введения одного из тех двух противораковых средств по отдельности, возможно свыше суммарных эффектов, которые можно ожидать.

Терапевтические эффекты состава на основе ВО-11Х можно оценивать в одной из нескольких клеточных моделей, которые основаны на отдельной или смешанной клеточной культуре, в том числе первичных раковых клетках или установленных линиях раковых клеток, предпочтительно человеческого происхождения. Примеры линий раковых клеток для проведения проверки составов на основе ВО-11Х можно устанавливать в соответствии с типом рака, таким как меланома (клетки человека SK-Mel-19, SK-Mel-103 и UACC62; мышинные клетки B16), карцинома (клетки мыши Нера 1-6; клетки крысы FAO), рак

молочной железы (клетки человека BT483, HCC1143, HCC1937, MDA-MB-231, MDA-MB-415, MDA-MB-468 и BT549), рак поджелудочной железы (клетки человека MiaPaCa2, IMIM-PC2, Panc1, Panc0203, Panc 3.27 или BxPc3) или другие релевантные клеточные линии, которые доступны из ATCC, других официальных или академических хранилищ или от коммерческих поставщиков. Противораковые эффекты составов на основе ВО-11Х можно оценивать по уровню периода времени, частоты и/или дозы, требуемых для осуществления блокировки пролиферации, гибели, экспрессии биологических маркеров и/или высвобождения сигнальных молекул (таких как хемокины или интерферон бета), которые свидетельствуют о потенциально релевантном эффекте состава на основе ВО-11Х, который должен быть подтвержден в более физиологических условиях.

Затем эффекты состава на основе ВО-11Х можно оценивать в животных моделях опухолей, с помощью которых анализируют противоопухолевый ответ после введения иллюстративного состава, такого как на основе ВО-112, согласно различным протоколам как для монотерапии, так и комбинированного лечения (например, совместно с СР1, таким как антитело к PD-1) на протяжении более короткого или более длительного периода времени после введения. Исследование можно продолжать с помощью введения ВО-112 и/или антитела к PD-1 животным в заданное время развития опухоли по причине пролиферации инъецированных клеток, которое осуществляют спустя конкретное количество дней после инъекции раковых клеток или (предпочтительно) при проявлении опухоли необходимого размера (например, среднего размера, составляющего 80-100 мм³), или даже после ее исчезновения (для оценки любого эффекта каждого лекарственного средства или комбинации лекарственных средств на рецидив опухоли). Исследование также должно включать контрольные соединения, которые являются как отрицательными (например, носитель отдельно), так и положительными контролями, такие как химиотерапевтические или другие противораковые лекарственные средства, которые отмечены в литературе в качестве стандарта эффективности лекарственного средства в отношении конкретной опухоли и/или данной животной модели. Данные операции по проверке в животных моделях и животной клетке могут также привести к разработке состава на основе ВО-11Х для ветеринарного применения.

Животная модель обычно представляет собой мышиную модель, в которой рак является следствием либо переноса и приживления человеческих раковых клеток (взятых из иммортализованной клеточной линии или биоптата рака, который получен у пациента), либо индуцирования (или переноса) мышинных опухолевых клеток у животных. Клетки могут происходить из различных типов опухолей (например, карциномы легкого, меланомы, лимфомы) и могут быть инъецированы подкожно в боковую часть мышцы для облегчения выявления опухоли и анализа ее размера и/или состава на протяжении исследования. Затем мышей подвергают рандомизации на группы, каждая из которых характеризуется численностью, позволяющей провести статистический анализ результатов (например, 3, 5, 10, 12, 15, 20 или больше животных на каждую контрольную группу или группу обработки).

Характеристики, которые могут улучшать состав на основе ВО-11Х, такой как ВО-112, и ингибитор контрольных точек, такой как антитело к PD-1, в животных моделях рака (в частности, при соответствующем комбинировании касательно количества, порядка или другого критерия введения) могут включать выживаемость животных после лечения и/или исчезновения опухоли, уменьшенную частоту рецидивов опухоли, ограниченные или отсроченные эффекты токсичности и/или устойчивости и ответ на повторное заражение инокуляцией опухоли после прекращения лечения с помощью ВО-112 и/или антитела к PD-1.

Иллюстративный состав на основе ВО-11Х, который по своей структуре и функциям определен выше как ВО-112 и антитело к PD-1, можно вводить (отдельно или в комбинации, в однократной или многократных дозах) в различные локализации относительно опухолевых клеток и/или в разном количестве. Обычно ВО-112 и моноклональное антитело, специфичное в отношении PD-1 мыши (например, клон RMP1-14 от BioLegend или похожие антитела, доступные от других поставщиков), инъецируют подкожно, интравезикулярно, интраперитонеально, перитуморально или интратуморально (в зависимости от модели и молекулярных и патологических характеристик опухоли) при концентрации, которую определяют с учетом веса животного (например, от 0,01 до 2,5 мг/кг), концентрации в инъецируемом объеме (например, от 0,01 до 0,5 мл) и/или содержания в каждой дозе (например, от 0,01 до 250 мкг на дозу). В частности, дозозависимый эффект ВО-112 в различных концентрациях, объединенного с фиксированной дозой антитела к PD-1 (или наоборот), может позволить определить любой полезный эффект, который является следствием существенного уменьшения количества любого соединения, которое вводят, благодаря объединению с другим соединением (например, профиль неизменной или даже улучшенной эффективности и/или безопасности; тормозящие эффекты в опухолях, которые находятся в разных необработанных локализациях).

ВО-112 можно инъецировать за один цикл или за несколько циклов (например, 2, 3, 4 или больше), которые отделены заданным количеством дней (1, 2, 3, 5, 7 или больше). Альтернативно при совместном введении ВО-112 с антителом к PD-1 ВО-112 можно инъецировать непосредственно до (или после) антитела (или в одном инъекционном препарате), опять же за один цикл или за несколько циклов (которые отделены заданным количеством дней). Еще в качестве альтернативы два средства можно составлять или вводить в любом последовательном порядке, но разделять варьирующим периодом времени (например,

1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 ч, 2 дня или больше). В частности, при введении ВО-112 после антитела к PD-1 его более позднее введение (отдельно или дополнительно в комбинации с антителом к PD-1) может обеспечивать противоопухолевый лечебный эффект у животных, у которых антитело к PD-1 являлось неэффективным против опухолевых клеток, преодолевая устойчивость к какой-либо конкретной опухоли или механизм ускользания. В конце обработки всех выживших животных можно оставить без обработки на 1, 2, 3 или больше последовательных недель для контроля, появятся ли снова опухолевые клетки и сколько, с повторным заражением всех животных, у которых наблюдалась полная регрессия опухоли, с помощью дополнительной подкожной инъекции раковых клеток или без него.

Эффекты ВО-112 отдельно или в комбинации с антителом к PD1, как перечислено выше, можно расценивать как предварительные результаты, о которых сообщают на протяжении исследования без умерщвления животных (например, путем определения размера опухоли, процентной доли выживших на тот момент мышей, веса тела или поведенческих критериев) или после умерщвления животного (или уже у мертвой мыши) для определения молекулярных характеристик опухолевых и/или нормальных клеток, в том числе общего количества и/или конкретных субпопуляций NK-клеток, инфильтрованных в опухоль лимфоцитов, спленоцитов, внедрения предшественников с радиоактивной меткой и других клеток, которые могут участвовать в противоопухолевом местном или системном иммунных ответах, таких как супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), регуляторные Т-клетки (Treg), ассоциированные с опухолью нейтрофилы (TAN), макрофаги M2 и ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM). Параллельно можно определять присутствие/отсутствие релевантных биологических маркеров по ПЦР-амплификации релевантных РНК или по уровню белка на поверхности клеток в тканях или циркулирующих в крови, таких как цитокины или хемокины, с применением стандартных иммунологических анализов и наборов.

Данный глобальный анализ фенотипа можно выполнять с использованием клеток, выделенных из опухолей, крови, селезенки, лимфатических узлов или других релевантных тканей и локализаций, для определения какого-либо статистически и/или терапевтически релевантного изменения количества клеток, экспрессирующих маркеры клеточной поверхности, которые выявляют с помощью проточной цитометрии, и они описаны в литературе как CD3, CD4, CD25, FoxP3, CD8, PD-1, PD-L1, PD-L2, PTEN, CTLA-4, CD137, CD96, CD73, CD90, CD47, CD69, CD26, TIM3, LAG3, Gr1, CD11b, Ly6C, Ly6G, NKp46, CD16, NKG2D, NKp44, NKp30, CD45 и CD31. Такие клетки также можно оценивать по уровню специфичного к опухолевому антигену иммунного ответа, экспрессии релевантных факторов транскрипции, цитокинов или хемокинов (например, IFN- γ , IFN- β , TNF- α , HIF1a, HIF2a, p53) или с помощью других клеточных анализов.

Дополнительно макроскопическое исследование органов и кожи и микроскопический анализ на наличие патологий в какой-либо из иммунодефицитных полностью иммунокомпетентных животных моделей может дополнительно предоставить сведения об эффективности исследуемых соединений (отдельно или в комбинации) или их токсичности, к примеру, воспаление органа и аутопсия. Количественные данные, которые получены в сходных исследованиях, можно сравнивать у разных экспериментальных групп с помощью соответствующих статистических исследований, с поправками на множественное исследование или без них, с целью оценки, какие терапевтические (в частности, противоопухолевый) эффекты обеспечиваются введением состава на основе ВО-11X отдельно или в комбинации с другим противораковым средством.

Способы лечения и отбор пациентов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, уменьшения, облегчения или предупреждения роста раковой опухоли, метастазирования, эпителиально-мезенхимального перехода, ускользания от иммунного ответа или рецидива, обеспечения выживаемости, включающему введение состава на основе ВО-11X и одного или более иммуномодулирующих средств. Рак может представлять собой онкологическое заболевание. Рак может представлять собой латентную опухоль, которая может являться результатом метастазирования рака. Латентная опухоль также может оставаться после хирургического удаления опухоли. Рецидив рака может представлять собой, например, повторный рост опухоли, метастазирование в легкие или метастазирование в печень.

В различных вариантах осуществления рак представляет собой один или более из базальноклеточной карциномы; рака желчных протоков; рака мочевого пузыря; рака кости; рака мозга и центральной нервной системы; рака молочной железы; рака брюшины; хориокарциномы; рака соединительной ткани; рак пищеварительной системы (в том числе рак пищевода, желудка, толстой кишки, прямой кишки или другой рак желудочно-кишечного тракта); рака глаза; рака головы и шеи; глиобластомы; печеночной карциномы; гепатомы; интраэпителиальной неоплазмы; рака почки, надпочечника или почки; лейкемии; рака печени; рака легкого (например, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого и плоскоклеточной карциномы легкого); меланомы; миеломы; нейробластомы; рака ротовой полости (например, рака губы, гортани, языка, рта и глотки); рака поджелудочной железы; рака предстательной железы; ретинобластомы; рабдомиосаркомы; рака дыхательной системы; карциномы слюнной железы; рака кожи; плоскоклеточного рака; рака яичка; рака щитовидной железы; рака матки, эндометрия, шейки матки, вульвы, яичника или другого гинекологического рака; рака моче-

выводящей системы; лимфомы, в том числе В-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (NHL; в том числе конкретных типов, таких как низкодифференцированная/фолликулярная, мелкоклеточная лимфоцитарная, среднелдифференцированная/фолликулярная, среднелдифференцированная диффузная, высокодифференцированная иммуннобластная, высокодифференцированная лимфобластная, высокодифференцированная мелкоклеточная с нерассеченными ядрами или генерализованная NHL); лимфомы из клеток мантийной зоны и СПИД-ассоциированная лимфома; хронической лимфоцитарной лейкемии; острой лимфобластной лейкемии; волосатоклеточной лейкемии; хронической миелобластной лейкемии; а также других карцином и сарком; посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства (PTLD), а также аномальной сосудистой пролиферации, ассоциированной с факоматозами или отеком (такими, как ассоциированные с опухолями мозга).

В различных вариантах осуществления рак представляет собой рак желчных протоков. В некоторых вариантах осуществления рак желчных протоков выбран из рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчного протока и рака фатеровой ампулы. В различных вариантах осуществления рак представляет собой рак печени. В различных вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак желчных протоков представляет собой холангиокарциному и/или аденокарциному.

В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X и/или иммуномодулирующее средство применяют для лечения видов рака на различных стадиях (например, на стадии I, или II, или III, или IV). В качестве неограничивающего примера с использованием общей группировки по стадиям виды рака I стадии локализованы в одной части тела; виды рака II стадии местно распространены, как и виды рака III стадии. Будет ли рак отнесен ко II стадии или III стадии, может зависеть от конкретного типа рака. В одном неограничивающем примере при болезни Ходжкина на II стадии отмечаются пораженные лимфатические узлы только на одной стороне диафрагмы, тогда как на III стадии отмечаются пораженные лимфатические узлы на верхней и нижней сторонах диафрагмы. Конкретные критерии для II и III стадий, следовательно, отличаются в соответствии с диагнозом. Виды рака на IV стадии часто метастазируют или распространяются в другие органы или по всему телу.

В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X (и/или иммуномодулирующее средство) уменьшает побочные эффекты тех видов терапии, которым может подвергаться пациент. Например, комбинированная терапия с помощью состава на основе BO-11X и одного или более иммуномодулирующих средств может обеспечивать более низкую дозу состава на основе BO-11X и/или одного или более иммуномодулирующих средств (например, по сравнению с монотерапией) и, таким образом, увеличивать терапевтическое окно любого средства. В некоторых вариантах осуществления сниженная доза смягчает один или более побочных эффектов без потери (или с минимальной потерей) эффективности. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X и/или иммуномодулирующее средство применяют для лечения субъекта, страдающего резистентным к лечению раком. В некоторых вариантах осуществления состав на основе BO-11X применяют для лечения субъекта, являющегося резистентным к одному или более иммуномодулирующим средствам, в частности к средству, которое фактически объединено с составом на основе BO-11X.

Например, в некоторых вариантах осуществления субъект является резистентным к средствам PD-1, и/или PD-L1, и/или PD-L2, включая, например, пациентов, резистентных к ниволумабу (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO), пембролизумабу (KEYTRUDA), пидилизумабу (CT-011), MK-3475, BMS-936559, ибрутинибу и/или MPDL3280A. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект является резистентным к средству, представляющему собой антитело к CTLA-4, например, пациенты, резистентные к ипилимумабу (Yervoy) (например, пациенты, страдающие меланомой). В некоторых вариантах осуществления субъект является резистентным к составу на основе BO-11X. Соответственно, в различных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака, которые обеспечивают спасение пациентов, которые нечувствительны к различным видам терапии, в том числе монотерапии с помощью состава на основе BO-11X или одного или более иммуномодулирующих средств.

В различных вариантах осуществления термины "пациент" и "субъект" используют взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления субъект и/или животное представляет собой млекопитающее, например человека, мышь, крысу, морскую свинку, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью, кролика, овцу или отличного от человека примата, такого как обезьяну (например, бабуина) или шимпанзе.

В различных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению являются приемлемыми в лечении субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления человек является ребенком. В других вариантах осуществления человек является взрослым человеком. В других вариантах осуществления человек является человеком пожилого возраста. В других вариантах осуществления человека можно называть пациентом или субъектом. В некоторых вариантах осуществления человек является особью женского пола. В некоторых вариантах осуществления человек является особью мужского пола.

Схемы лечения и виды комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает конкретные схемы лечения рака с помощью составов на основе BO-11X и иммуномодулирующих средств (и необязательно

одного или более дополнительных терапевтических средств). Например, в некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11X, например ВО-111 или ВО-112, вводят пациенту первым для нормализации образования сосудов в опухоли, при этом необязательно путем уменьшения или устранения гипоксии. Такое первоочередное введение состава на основе ВО-11X, например ВО-111 или ВО-112, может стимулировать и/или увеличивать количество противоопухолевых Т-лимфоцитов (например, CD4+ и CD8+ Т-клеток) и/или NK-клеток, и/или ингибировать и/или снижать рекрутирование иммуносупрессорных клеток (например, супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), регуляторных Т-клеток (Treg), ассоциированных с опухолью нейтрофилов (TAN), макрофагов M2 и макрофагов, ассоциированных с опухолью (TAM)) в отношении опухоли. В некоторых вариантах осуществления существующие виды терапии могут изменять соотношение макрофагов M1 относительно M2 в месте опухоли с преимуществом макрофагов M1. Следует отметить, что составы на основе ВО-11X в отличие от, например, антиангиогенных молекул, в некоторых вариантах осуществления индуцируют долговременную (т.е. больше временной) нормализацию образования сосудов. Например, нормализация образования сосудов посредством состава на основе ВО-11X может длиться более чем 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 14 дней, или 21 день. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данная долговременная нормализация образования сосудов посредством состава на основе ВО-11X обеспечивает устойчивое перmissive микроокружение опухоли, которое, по всей вероятности, будет чувствительным к одному или более иммуномодулирующим средствам. Иными словами, в некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11X усиливает терапию на основе иммуномодулирующих средств.

Альтернативно состав на основе ВО-11X, например ВО-111 или ВО-112, вводят пациенту после лечения с помощью одного или более иммуномодулирующих средств. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство нацеливается на одну или более совместно ингибирующих молекул и уменьшает или элиминирует иммуносупрессию. В данном благоприятном контексте, т.е. при устранении супрессии, состав на основе ВО-11X, например ВО-111 или ВО-112, вводят для стимуляции иммунной системы. Или сперва иммуномодулирующее средство нацеливается на одну или более совместно стимулирующих молекул, и состав на основе ВО-11X, например ВО-111 или ВО-112, вводят второстепенно для усиления данного эффекта, например, синергетически.

Дополнительно, как описано в настоящем документе, состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство можно объединять с дополнительным терапевтическим средством в контексте, например, совместного введения, схемы лечения или совместного составления.

В некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство, необязательно с дополнительным терапевтическим средством, можно вводить последовательно. Термин "последовательно", как применяется в настоящем документе, означает, что дополнительное терапевтическое средство и состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство вводят раздельно во времени с интервалом, составляющим более чем приблизительно 60 мин. Например, временной промежуток между последовательным введением дополнительного терапевтического средства и состава на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующего средства может составлять более чем приблизительно 60 мин, более чем приблизительно 2 ч, более чем приблизительно 5 ч, более чем приблизительно 10 ч, более чем приблизительно 1 день, более чем приблизительно 2 дня, более чем приблизительно 3 дня или более чем приблизительно 1 неделю. Оптимальное время введения может зависеть от уровней метаболизма, экскреции и/или фармакодинамической активности подлежащих введению дополнительного терапевтического средства и состава на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующего средства. Как дополнительное терапевтическое средство, так и средства по настоящему изобретению можно вводить первыми.

В некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство, необязательно с дополнительным терапевтическим средством, можно вводить одновременно. Термин "одновременно", как применяется в настоящем документе, означает, что дополнительное терапевтическое средство и состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство вводят раздельно во времени с интервалом, составляющим не более чем приблизительно 60 мин, как, например, не более чем приблизительно 30 мин, не более чем приблизительно 20 мин, не более чем приблизительно 10 мин, не более чем приблизительно 5 мин или не более чем приблизительно 1 мин. Введение дополнительного терапевтического средства и состава на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующего средства можно осуществлять с помощью одновременного введения одного состава (например, состава, содержащего дополнительное терапевтическое средство и состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство) или отдельных составов (например, первого состава, содержащего дополнительное терапевтическое средство, и второго состава, содержащего состав на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующее средство).

Совместное введение также не требует, чтобы дополнительное терапевтическое средство вводили субъекту посредством того же пути введения. Скорее каждое терапевтическое средство можно вводить любым соответствующим путем, например парентерально или непарентерально.

Такая комбинация может приводить к синергизму и/или к суммарным и/или усиленным эффектам при более низкой дозе состава на основе ВО-11X и/или иммуномодулирующего средства. Например, при

объединении состава на основе ВО-11Х с одним или более иммуномодулирующих средств эффективное количество состава на основе ВО-11Х может быть ниже, чем оно было бы при монотерапии. В некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11Х объединяют с иммуномодулирующим средством, и эффективное количество состава на основе ВО-11Х представляет собой субтерапевтическую дозу, например, при объединении иммуномодулирующего средства с составом на основе ВО-11Х эффективное количество иммуномодулирующего средства может быть ниже, чем оно было бы при монотерапии. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство объединяют с составом на основе ВО-11Х, и эффективное количество иммуномодулирующего средства представляет собой субтерапевтическую дозу. В различных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство объединяют с составом на основе ВО-11Х и дополнительным терапевтическим средством, и эффективное количество дополнительного терапевтического средства представляет собой субтерапевтическую дозу. Термин "субтерапевтическая доза или количество" означает, что доза или количество фармакологически активного вещества являются ниже дозы или количества этого вещества, которое вводят в виде единственного вещества для достижения терапевтического эффекта. Субтерапевтическая доза такого вещества может варьировать в зависимости от субъекта и состояния при заболевании, которое подлежит лечению, веса и возраста субъекта, тяжести состояния при заболевании, способа введения и т.п., что может легко определить специалист в данной области техники. В одном варианте осуществления субтерапевтическая доза или количество химиотерапевтического средства составляет менее 90% одобренной полной дозы химиотерапевтического средства, например, предоставленной в виде одобренной Управлением по продовольствию и лекарствам США информации на этикетке для химиотерапевтического средства. В других вариантах осуществления субтерапевтическая доза или количество химиотерапевтического средства составляют менее 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или даже 10% одобренной полной дозы, к примеру, от 20 до 90%, от 30 до 80%, от 40 до 70% или находятся в другом диапазоне значений, предусмотренных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иммуномодулирующего средства является меньше эффективного количества, применяемого в монотерапии при том же виде рака и/или в комбинированной терапии со средством, помимо состава на основе ВО-11Х, при том же виде рака. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество состава на основе ВО-11Х является меньше эффективного количества, применяемого в монотерапии при том же виде рака и/или в комбинированной терапии со средством (таким как иммуномодулирующее средство) при том же виде рака или клиническом статусе.

В различных вариантах осуществления состав на основе ВО-11Х объединяют с одним или более иммуномодулирующих средств (например, с 1, или 2, или 3, или 4, или 5 иммуномодулирующими средствами) и необязательно с одним или более дополнительных терапевтических средств (например, с 1, или 2, или 3, или 4, или 5 дополнительными терапевтическими средствами). Такие комбинации могут приводить к синергизму и/или к суммарным и/или усиленным эффектам при более низкой дозе состава на основе ВО-11Х, и/или иммуномодулирующего средства, и/или одного или более дополнительных терапевтических средств. Совместное введение может являться одновременным или последовательным. Дополнительно фармацевтические композиции, включающие состав на основе ВО-11Х и/или иммуномодулирующее средство, могут содержать дополнительное терапевтическое средство (например, посредством совместного составления). То есть в некоторых вариантах осуществления два или более из любых средств, раскрытых в настоящем документе, могут быть совместно составленными.

Дополнительно в некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11Х и/или иммуномодулирующее средство можно вводить пациенту, который проходит лечение с помощью одного или более дополнительных терапевтических средств. Дополнительно в некоторых вариантах осуществления состав на основе ВО-11Х и/или иммуномодулирующее средство могут заменить текущее лечение пациента с помощью одного или более дополнительных терапевтических средств.

Вспомогательная терапия, также называемая вспомогательным уходом, представляет собой лечение, которое осуществляется в дополнение к первичному, основному или исходному лечению. В качестве неограничивающего примера вспомогательная терапия может представлять собой дополнительное лечение, обычно назначаемое после хирургического вмешательства, когда удаляют все выявляемые признаки заболевания, но остается статистический риск рецидива по причине скрытых признаков заболевания. В некоторых вариантах осуществления средства, описанные в настоящем документе, применяют в качестве вспомогательной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, описанные в настоящем документе, вводят в качестве неовспомогательной терапии перед резекцией. В определенных вариантах осуществления неовспомогательная терапия относится к терапии для сжатия и/или понижения степени злокачественности опухоли перед каким-либо хирургическим вмешательством. В некоторых вариантах осуществления неовспомогательная терапия означает терапевтическое средство, описанное в настоящем документе, которое вводят пациентам, страдающим раком, перед хирургическим вмешательством или применением иной методики, обеспечивающей абляцию опухоли.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства, описанные в настоящем доку-

менте, являются приемлемыми в качестве поддерживающей терапии после исходного лечения с помощью терапии первой линии, включая без ограничения любые дополнительные терапевтические средства по настоящему изобретению.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает схему лечения или способ лечения рака или опухолей у субъекта, которые включают введение одновременно или последовательно терапевтически эффективного количества состава на основе BO-11X и/или иммуномодулирующего средства и одного или более дополнительных терапевтических средств, описанных в настоящем документе. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает схему лечения или способ лечения рака или опухолей у субъекта, которые включают введение одновременно или последовательно терапевтически эффективного количества состава на основе BO-11X и/или иммуномодулирующего средства и одного или более противораковых средств, описанных в настоящем документе, в том числе без ограничения химиотерапевтических средств. Подходящие химиотерапевтические средства, подлежащие применению в способах по настоящему изобретению, могут включать средства, описанные в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой одно или более из 5-фторурацила (5-FU), доксорубина, гемцитабина, паклитаксела и пиплатина. В качестве примера в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает комбинирование состава на основе BO-11X и/или иммуномодулирующего средства с одной или более из обычных схем лечения рака (в качестве неограничивающего иллюстративного примера FOLFOX, FOLFIRI, IFL, FL (Mayo), QUASAR, Machover schedule, CAF, CMF, ECF и FEC).

В различных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой антигиперпролиферативное средство.

Антигиперпролиферативные средства включают без ограничения доксорубин, даунорубин, митомицин, актиномицин D, блеомицин, цисплатин, VP16, ендиин, таксол, винкристин, винбластин, кармустин, мелфалан, циклофосфамид, хлорамбуцил, бусульфид, ломустин, 5-фторурацил, гемцитабин, BCNU или камптотецин.

В дополнение дополнительное терапевтическое средство может также включать применение излучения. В дополнение, способы лечения могут дополнительно включать применение фотодинамической терапии.

Соли, фармацевтические композиции и дозы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средства, описанные в настоящем документе, и их фармацевтически приемлемые сложные эфиры, пролекарства, соли, сольваты, энантиомеры, стереоизомеры, активные метаболиты, сокристаллы и другие физиологически функциональные производные.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Фармацевтическая композиция может находиться в любой подходящей форме, соответствующей необходимому применению и пути введения. Фармацевтические наполнители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Фармацевтические наполнители могут представлять собой, например, солевой раствор, сенегальскую камедь, желатин, пасту на основе крахмала, тальк, кератин, коллоидный диоксид кремния, мочевины и т.п. В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемые наполнители являются стерильными при введении субъекту. Вода является приемлемым наполнителем, если какое-либо из средств, описанных в настоящем документе, вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно применять в качестве жидких наполнителей, особенно для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические наполнители также включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. Другие примеры подходящих фармацевтических наполнителей описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (под ред. Allen, Loyd V., Jr; 22nd edition, 2012).

Дополнительно фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства, средства, буферные средства для поддержания pH и диспергирующие средства. Кроме того, могут быть включены вспомогательные, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и окрашивающие вещества. Предотвращения действия микроорганизмов можно добиться посредством включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Фармацевтические композиции также могут включать изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия и т.п.

При необходимости фармацевтические композиции также могут включать солюбилизующее средство. Также средства можно доставлять с помощью подходящего носителя или устройства для доставки, известных из уровня техники. Композиции для введения могут необязательно включать местный

анестетик, такой как, например, лидокаин, для уменьшения боли в месте инъекции.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, драже, таблеток, пилюль, гранул, капсул, капсул, содержащих жидкости, порошков, составов с замедленным высвобождением, суппозиториев, эмульсий, аэрозолей, спреев, суспензий или любую другую форму, подходящую для применения. Таким образом, композиция, описанная в настоящем документе, может содержаться в капсуле, таблетке, пилюле, капсуловидной таблетке, бутылке, ампуле, саше, шприце, картридже, небулайзере или другом контейнере. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в форме капсулы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в форме таблетки.

В некоторых вариантах осуществления введение любого из описанных средств и композиций представляет собой любое из перорального, внутривенного и парентерального введения. В различных вариантах осуществления пути введения включают, например, пероральный, интрадермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный, сублингвальный, интраназальный, интрацеребральный, интрагепатический, интрапанкреатический, интравезикулярный, интравагинальный, трансдермальный, ректальный, путем ингаляции или местно, например, в уши, нос, глаза или на кожу. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем пероральной или парентеральной инъекции. Способ введения можно оставить на усмотрение врача, и он отчасти зависит от локализации медицинского состояния и/или одновременно применяемых видов лечения (являющихся, например, химиотерапией, лучевой терапией, или в комбинации с антителами, вакцинами и другими нацеливающими на рак лекарственными средствами). В различных вариантах осуществления введение приводит к высвобождению какого-либо средства, описанного в настоящем документе, в кровеносное русло.

Любое средство и/или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем документе, можно вводить перорально. Такие средства и/или фармацевтические композиции также можно вводить любым другим удобным путем, например, с помощью внутривенной инфузии или болюсной инъекции, поглощения через эпителиальный или кожно-слизистый слой (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и тонкого кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с дополнительным терапевтическим средством. Введение может быть системным или местным. Известны различные системы доставки, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, капсулах и т.д., и их можно применять. В конкретных вариантах осуществления может быть желательным введение местно в область, нуждающуюся в лечении.

В одном варианте осуществления средство, описанное в настоящем документе, и/или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, составляют в соответствии с обычными процедурами в виде композиции, адаптированной для перорального введения людям. Твердые лекарственные формы для перорального введения включают, например, капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких лекарственных формах активное средство смешано по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым наполнителем или носителем, таким как цитрат натрия, фосфат дикальция и т.д., и/или а) наполнителями или разбавителями, такими как разновидности крахмала, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит, кремниевая кислота, микрокристаллическая целлюлоза, Bakers Special Sugar и т.д.; б) связывающими средствами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон и т.д.; в) увлажняющими средствами, такими как глицерин и т.д.; г) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты, карбонат натрия, сшитые полимеры, такие как кросповидон (сшитый поливинилпирролидон), кроскармеллоза натрия (сшитая карбоксиметилцеллюлоза натрия), натрия крахмалгликолят и т.д.; д) средствами, замедляющими схватывание раствора, такими как парафин и т.д.; е) ускорителями всасывания, такими как средства на основе четвертичного аммония и т.д.; ж) смачивающими средствами, такими как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина и т.д., з) абсорбентами, такими как каолиновая и бетонитовая глина и т.д., и и) смазывающими средствами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, глицерилбенгнат и т.д., и смесями таких наполнителей. Специалисту в данной области техники будет понятно, что конкретные наполнители могут характеризоваться двумя или более функциями в лекарственной форме для перорального применения. В случае лекарственной формы для перорального применения, например, капсулы или таблетки, лекарственная форма также может содержать буферные средства.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным средствам жидкие лекарственной формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области техники, такие как, например, воду или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиновый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масло, масло зародышей, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли, сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения (например, внутривенного, внут-

римышечного, интрагепатического, интрапанкреатического, интраперитонеального, подкожного введения и внутрисуставной инъекции и инфузии), включают, например, растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии и т.п. Их также можно получать в форме стерильных твердых композиций (например, лиофилизированная композиция), которые можно растворять или суспендировать в стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением. Они могут содержать, например, суспендирующие или диспергирующие средства, известные в данной области техники. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению для парентеральной инъекции содержат фармацевтически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для восстановления в стерильных инъекционных растворах или дисперсиях непосредственно перед применением. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или носителей включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Можно поддерживать надлежащую текучесть, например, путем применения материалов для нанесения покрытия, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Любое средство, описанное в настоящем документе, и/или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить с помощью средств для контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения или с помощью устройств для доставки, известных специалистам в данной области техники. Такие лекарственные формы могут быть применимы для обеспечения контролируемого или замедленного высвобождения одного или более активных ингредиентов с использованием, например, гидропропилцеллюлозы, гидропропилметилцеллюлозы, поливинилпирролидона, Eudragit, других полимерных матриц, гелей, проницаемых мембран, осмотических систем, многослойных покрытий, микрочастиц, липосом, микросфер или их комбинаций с обеспечением необходимого профиля высвобождения в различных пропорциях. Подходящие составы с контролируемым или замедленным высвобождением можно легко выбрать для применения с активными ингредиентами средств, описанных в настоящем документе. Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает единичные дозированные лекарственные формы, подходящие для перорального введения, такие как без ограничения таблетки, капсулы, желатиновые капсулы и капсуловидные таблетки, которые адаптированы для контролируемого или замедленного высвобождения.

Составы, содержащие средства, описанные в настоящем документе, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно в целях удобства предоставлять в единичных лекарственных формах и можно получать с помощью любых способов, известных в области фармацевтики. Такие способы, как правило, включают стадию объединения терапевтических средств с носителем, который представляет собой один или более добавочных ингредиентов. Обычно составы получают при однородном и непосредственном приведении терапевтического средства в связь с жидким носителем, мелкоизмельченным твердым носителем или ими обоими, а затем при необходимости формировании продукта в лекарственные формы необходимого состава (например, влажное или сухое гранулирование, получение порошкообразных смесей и т.д. с последующим таблетированием с применением традиционных способов, известных в области техники).

Следует отметить, что фактическая доза средств, описанных в настоящем документе, и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению, которые подлежат введению в соответствии с настоящим изобретением, может варьировать в зависимости от конкретного средства, конкретной лекарственной формы и способа введения. Специалист в данной области техники может принимать во внимание многие факторы, которые могут модифицировать действие составов на основе ВО-11Х (например, вес тела, пол, диета, время введения, путь введения, скорость экскреции, состояние субъекта, комбинации лекарственных средств, генетическая предрасположенность и чувствительность реакции). Введение можно выполнять непрерывно или же одной или более дискретными дозами в пределах максимальной переносимой дозы. Оптимальные скорости введения в случае данной совокупности условий может установить специалист в данной области техники с применением традиционных исследований в отношении введения дозировки.

Отдельные дозы средств, описанных в настоящем документе, и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно вводить в единичных лекарственных формах (например, таблетках или капсулах), содержащих, например, от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1000 мг молекул poly(I:C) в составе на основе ВО-11Х [например, где указанный отдельный состав на основе ВО-11Х образован путем получения комплекса из от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1000 мг poly(I:C)], включая все промежуточные значения и диапазоны. В некоторых вариантах осуществления средства, описанные в настоящем документе, и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят в количестве, составляющем от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1000 мг молекул poly(I:C), в составе на основе ВО-11Х ежедневно или от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 10 мг ежедневно [например, где указанный отдельный состав на основе ВО-11Х для ежедневного применения образован путем получения комплекса из от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1000 мг poly(I:C), предпочтительно от 0,01 мг до 10 мг], включая все промежуточные значения и диапазоны.

В некоторых вариантах осуществления подходящая дозировка средств и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению находится в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 мг молекул poly(I:C) в составе на основе ВО-11X/кг веса тела субъекта, предпочтительно от 0,003 до приблизительно 10 мг молекул poly(I:C) в составе на основе ВО-11X/кг веса тела субъекта, более предпочтительно от 0,005 до приблизительно 10 мг молекул poly(I:C) в составе на основе ВО-11X/кг веса тела субъекта и еще более предпочтительно от 0,01 до приблизительно 10 мг молекул poly(I:C) в составе на основе ВО-11X на 1 кг веса тела субъекта [например, где указанный вводимый отдельный состав на основе ВО-11X образован путем получения комплекса из от приблизительно 0,005 мг до приблизительно 10 мг poly(I:C) на 1 кг веса тела субъекта, предпочтительно от приблизительно 0,003 до приблизительно 10 мг poly(I:C) на 1 кг веса тела субъекта, более предпочтительно от приблизительно 0,001 до приблизительно 10 мг poly(I:C) на 1 кг веса тела субъекта], включая все промежуточные значения и диапазоны. В других вариантах осуществления подходящая дозировка состава на основе ВО-11X, и/или иммуномодулирующего средства, и/или дополнительного терапевтического средства находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг веса тела до приблизительно 10 мг/кг веса тела или в диапазоне от приблизительно 0,05 мг/кг веса тела до приблизительно 1 мг/кг веса тела.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения средства и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить, например, более чем один раз в день, приблизительно один раз в день, приблизительно каждый второй день, приблизительно каждый третий день, приблизительно один раз в неделю, приблизительно один раз в две недели, приблизительно один раз в месяц, приблизительно один раз в два месяца, приблизительно один раз в три месяца, приблизительно один раз в шесть месяцев или приблизительно один раз в год.

Наборы.

Настоящее изобретение также предусматривает наборы, которые могут облегчать введение средств и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. Набор представляет собой совокупность материалов или компонентов, включая по меньшей мере одно из средств, описанных в настоящем документе. Точная природа компонентов, скомпонованных в наборе, зависит от его предполагаемого назначения. В одном варианте осуществления набор скомпонован с целью лечения субъектов-людей.

В набор могут быть включены инструкции по применению. Инструкции по применению обычно включают ясную формулировку, описывающую методику, которой следует придерживаться при использовании компонентов набора для получения необходимого результата, такого как лечение, например, рака, диабета или ожирения. Необязательно набор также содержит другие применимые компоненты, такие как разбавители, буферы, фармацевтически приемлемые носители, шприцы, катетеры, аппликаторы, фильтры, (микро)иглы, инструменты для пипетирования или измерения, перевязочные материалы или другие применимые приспособления, легко узнаваемые специалистом в данной области техники.

Материалы и компоненты, собранные в наборе, могут быть предоставлены на хранение у практикующих врачей любыми удобными и подходящими способами, которые сохраняют их пригодность к работе и применению. Например, компоненты могут быть предусмотрены при комнатной температуре, при температурах охлаждения или замораживания. Компоненты обычно содержатся в подходящих упаковочных материалах. В различных вариантах осуществления упаковочный материал создан с помощью хорошо известных способов, предпочтительно с обеспечением стерильного, не содержащего загрязняющих веществ окружения. Упаковочный материал может иметь внешнюю этикетку, на которой отмечены содержимое и/или предназначение набора и/или его компонентов.

Поскольку настоящее изобретение описано вместе с его конкретными вариантами осуществления, будет понятно, что возможны дополнительные модификации, а также предполагается, что данная заявка охватывает любые вариации, применения или адаптации настоящего изобретения, следуя, в общем, принципам настоящего изобретения и включая такие отклонения от настоящего раскрытия, которые имеют место в известной или обычной практике в рамках данной области техники, которой принадлежит настоящее изобретение, и которые могут применяться к основным характеристикам, изложенным выше, и как следует из объема прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Влияние размера комплекса отдельных препаратов poly(I:C) на основе jetPEI (составы на основе ВО-111) на противораковые эффекты.

Материалы и способы.

Составы на основе ВО-111 (способ с 2 флаконами).

Молекулы одноцепочечной полиинозиновой кислоты [poly(I)] и полицитидиловой кислоты [poly(C)], которые применяли для получения двухнитевой полиинозиновой-полицитидиловой кислоты [молекулы poly(I:C)], получали от коммерческих поставщиков, таких как Tide Group, Carbogen или Invivogen. В зависимости от поставщика и партии распределение молекул poly(C) по размеру определяли следующим образом: <400 оснований, 20-82% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 33%, 43% или 50%); 400-850 оснований, 15-40% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 27%,

30% или 37%); 850-5000 оснований, 3-50% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 13%, 30% или 34%); >5000 оснований, 1% или меньше (в целом отсутствует). В зависимости от поставщика и партии распределение молекул poly(I) по размеру определяли следующим образом: <400 оснований, 80-95% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 86% и 91%); 400-850 оснований, 5-20% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 8% или 12%); 850-5000 оснований, 0-5% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 1% или ниже); >5000 оснований, 1% или меньше (в целом отсутствует). Критерии соответствия для получаемых составов на основе ВО-111, которые применяются в отношении порошка или растворов poly(I) и poly(C), также включают максимум поглощения (при длине волны 248×1 нм и 268±1 нм для poly(I) и poly(C) соответственно), содержание эндотоксинов (≤10 EU/мг), pH (6,0-8,0) и коэффициент седиментации (≥4S).

Партию препаратов poly(I) получали с помощью растворения порошка poly(I) (1,0 экв., 23,99 г) при 50°C в PBS 1 × (2,4 л) с непрерывным перемешиванием в 6-литровой колбе. Партию препаратов poly(C) получали отдельно с применением порошка poly(C) таким же образом и в той же концентрации. Можно осуществлять дополнительные стадии фильтрования для дальнейшего улучшения качества исходных растворов с использованием мембран с отсевом в 300 кДа или с отсевом в 500 кДа (кассета Pellicon 2, Millipore). Фильтраты после данных стадий фильтрования концентрировали и очищали от низкомолекулярных примесей, таких как мономеры, через мембрану в 30 кДа (кассета Pellicon 2, Millipore). Полученный ретентат каждого раствора смешивали с концентрированным буферным раствором (таким как PBS 10X). Для обоих растворов определяли оптическую плотность для расчета концентрации в качестве основания для стехиометрии 1:1 для последующей стадии гибридизации, регулируя таким образом общий объем до стадии гибридизации. Раствор poly(I) перемешивали и смешивали с молекулами раствора poly(C) при 55-62°C в течение 30 мин. Полученный раствор медленно охлаждали до комнатной температуры в течение примерно 3 ч для гибридизации одноцепочечных молекул и получения молекул poly(I:C) и в заключение фильтровали через стеклянный пористый фильтр G3 (размер пор примерно 15-40 мкм).

В результате данного процесса гибридизации получали раствор, содержащий пул различных двухнитевых молекул poly(I:C), который затем вводили в хроматографическую колонку GPC. Хроматографию выполняли на стеклянной колонке Omnitfit с диаметром 5 см, которую наполняли взвесью 700 мл Toyopearl HW-65F в 40 мМ натрий-фосфатном буфере. Взвесь оставляли медленно оседать, после чего промывали 40 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 6,9) при увеличении скорости потока от 10 до 60 мл/мин. Колонку устанавливали на устройстве для препаративной ВЭЖХ, состоящем из двух нагнетательных насосов, УФ-детектора, клапанов для отбора проб и компьютера. Реакционную смесь после гибридизации загружали в колонку и элюировали с помощью 40 мМ натрий-фосфатного буфера (поток = 50 мл/мин, pH 6,9). Целевые фракции отбирали, когда УФ-сигнал составлял от 100 до 1250 мВ, и объединяли для дополнительной обработки с применением четырех обессоливающих циклов разбавления и концентрирования с помощью устройства для создания тангенциального потока (TFF, Millipore Pellicon 2, регенерированная целлюлоза, оборудовано тремя мембранными кассетами по 0,1 м² каждая, с отсевом в 300 кДа). Впускное и выпускное отверстия соединяли с первой стеклянной бутылкой с объединенными хроматографическими фракциями.

Конечный ретентат и промывочный раствор фильтровали через мембрану с получением прозрачного бесцветного раствора, который обессоливали с помощью изопропанола, подвергали сублимационной сушке и лиофилизировали при комнатной температуре (при 1 мбар в течение примерно 5 дней).

Различные коммерческие In vivo-JetPEI [характеризующиеся средней молекулярной массой, составляющей от 8,3 до 22,5 кДа, и коэффициентом полидисперсности <1,5, как определили по PEOX (полиэтиленоксид, предшественник PEI) с помощью гелепроникающей хроматографии (GPC: SOP GPC-0044), и стерильно профильтрованные через фильтр 0,2 мкм] получали от PolyPlus (номер в каталоге 201-50G). Способ с 2 флаконами включает смешивание содержимого флакона 1, содержащего молекулы poly(I:C) (объем 1,0 мл или меньше при быстром пипетировании растворов или вплоть до 5,5 мл при использовании шприца), с содержимым флакона 2, содержащим раствор PEI (объем 1,0 мл или меньше при быстром пипетировании растворов или вплоть до 5,5 мл при использовании шприца). В качестве альтернативы содержимое флакона 1 отсасывают с помощью шприца (10 мл) и иглы (G20-0,9 мкм) и быстро разбрызгивают над поверхностью жидкости во флаконе 2. Полученный препарат ВО-111 затем фильтруют через мембрану с размером пор в диапазоне 1-5 мкм, обеспечивая удаление более крупных видимых частиц. Глюкозу (или маннит) включали в качестве наполнителя во флакон 1 с достижением 5% (вес./об.) концентрации в конечном препарате ВО-111 [т.е. указанная композиция образована путем дополнительного добавления глюкозы (или маннита) в концентрации 5% (вес./общий объем указанной композиции)]. Глюкозу широко применяли в качестве наполнителя, который обеспечивает приемлемую осмоляльность ВО-111 (302 мОсм/кг) без ухудшения функциональных или физико-химических характеристик и с избеганием потенциальных нежелательных побочных эффектов по причине введения маннита в высоких концентрациях.

Отдельные препараты ВО-111 получали путем однократного или двукратного фильтрования исходного раствора ВО-111 через ацетатцеллюлозную мембрану с разным размером пор (шприцевые фильтры Minisart® NML; Sartorius) в соответствии с инструкциями производителя. Альтернативно исходный препарат ВО-111 центрифугировали в течение 15 мин при заданной скорости с использованием ротора с постоянным углом наклона FA-45-24-11 для центрифуг 5415 D/5415 R (Eppendorf). Фильтрат после фильтрования через мембрану и надосадочную жидкость после центрифугирования соответственно хранили до использования при 4°C при концентрации poly(I:C), составляющей 0,5-0,8 мг/мл, как определено с помощью УФ. Затем концентрацию poly(I:C) рассчитывали заново перед каждым экспериментом, получая образец с одинаковой дозой для каждого состояния.

Размер молекул poly(I:C) в препаратах ВО-111 определяли с использованием агарозных гелей и меченых или меченых [³²P] препаратов poly(I) и poly(I:C). Вкратце, 1 мкг poly(I) и poly(I:C) (PBS) помещали в агарозный гель и выполняли электрофорез в течение 1 часа при 80 В в буфере TBE. В зависимости от распределения по размеру исходных молекул poly(C) и поли (I), распределение по размеру молекул poly(I:C), которые присутствуют в препаратах ВО-111, определяли следующим образом: <400 оснований, 7-57% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 15% или 21%); 400-850 оснований, 20-45% (с проведением дополнительных исследований с применением препаратов, обеспечивающих, например, 25% или 27%); 850-5000 оснований, 20-70% (с проведением дополнительных исследований с помощью препаратов, обеспечивающих, например, 52% или 53%); >5000 оснований, 0-9% (с проведением дополнительных исследований с помощью препаратов, обеспечивающих, например, 1% или 0%).

Аналитические технологии.

Значение зета-среднего (z-среднего) диаметра и коэффициента полидисперсности частиц Jet-PEI/poly(I:C) в отдельных препаратах ВО-111 (от 0,5 до 0,8 мг/мл, подлежит разбавлению для проведения клеточного и других анализов до концентрации poly(I:C), составляющей 1,0 мкг/мл) определяли с использованием Zetasizer Nano ZS согласно инструкциям производителя и в соответствии с ISO 22412, основанных на предположении, что указанные частицы являются сферическими. В общем, применяли динамическое рассеяние света (технология Nanosizer) с использованием программного обеспечения v7.11.

Функциональная характеристика препаратов ВО-111.

Различные препараты ВО-111 исследовали с использованием клеток меланомы человека, клеток поджелудочной железы человека или меланоцитов человека в соответствии с литературными данными, описывающими свойства комплексов ВО-110 (Pozuelo-Rubio M. et al., 2014; Tormo D. et al., 2009; WO 2011003883). Вкратце, анализы жизнеспособности клеток выполняли на адгезивных клетках по меньшей мере за 12 ч до обработки. Процентную долю клеточной гибели в заданные моменты времени и при концентрациях, используемых при обработке, оценивали с помощью стандартных анализов вытеснения трипанового синего на плавающих и адгезивных клетках, которые объединяли, окрашивали с помощью 0,4% раствора трипанового синего (Gibco Laboratories, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) и считали под световым микроскопом (подсчитывали минимум 100-500 клеток на обработку). Каждый препарат исследовали в течение периода, составляющего от 12 до 48 ч, и при концентрациях молекул poly(I:C) в различных препаратах, составляющих от 0,1 до 2,5 мкг/мл.

Результаты.

Существующий способ получения комплексов ВО-110, как описано в литературе (Pozuelo-Rubio M. et al., 2014; Tormo D. et al., 2009; WO 2011003883), подтвержден в лабораторном масштабе и характеризуется несколькими важными ограничениями относительно требований для получения материалов, которые можно исследовать в более крупном доклиническом масштабе, а затем для клинической оценки: ограниченная концентрация (не выше 0,05 мг/мл) и ограниченная возможность масштабирования, и в то же время необходимость сделать способ получения соответствующим GMP. В частности, способ получения должен обеспечивать получение партий состава, содержащего poly(I:C)-содержащие частицы, характеризующиеся физико-химическими характеристиками (такими как стерильность, распределение частиц по размеру, стабильность, отсутствие частиц видимого и подвидимого диапазона и концентрация, составляющая по меньшей мере 0,5 мг/мл), как можно более однородных среди отдельных препаратов для правильной оценки их биологической эффективности и медицинского применения в релевантных доклинических моделях и фармако-токсикологических анализах.

Первая стадия в достижении данных задач заключалась в замене стадии добавления капли за каплей раствора poly(I:C) к раствору JetPEI (или другого подобного способа, как в исходных препаратах ВО-110; WO 2011003883) и инкубировании смеси при комнатной температуре. Скорость смешивания идентифицировали как потенциально важный, еще не оцененный, фактор решения проблемы получения. Для этой цели создали новый тип состава poly(I:C)-PEI, называемый ВО-111, путем замены подхода смешивания нерасфасованных растворов, которые подлежат лиофилизации и упаковке во флаконы, на подход с получением двух флаконов, каждый из которых содержит требуемое количество JetPEI и молекул poly(I:C). Содержимое двух флаконов быстро смешивали с помощью инъектирования (или другими способами быстрого смешивания жидкостей, такими как быстрое пипетирование), при этом два раствора имели одинаковый объем. Полученный раствор имел объем, соответствующий последующим анализам и применению.

ям (например, 1,2 мл препарата ВО-111 при 0,5 мг/мл, полученного в результате смешивания 2 растворов, каждый из которых имел объем 0,6 мл).

Шприц и игла, применяемые для смешивания, создавали достаточную турбулентность для способствования быстрому смешиванию и быстрому образованию частиц в препаратах ВО-111, при этом с ограниченным количеством (или с отсутствием) видимых частиц. Конкретные технические детали способа получения ВО-111 можно адаптировать для обеспечения дополнительно увеличенного уровня активности, воспроизводимости, стабильности и/или гомогенности препаратов ВО-111, например, с помощью экстракции солей, удаления производственных остатков, фильтрования растворов с помощью фильтров с порами большего размера (например, в диапазоне от 1 до 5 мкм), быстрого пипетирования или перемешивания на вихре в двух растворах, выбора размера/диаметра шприца, быстрого добавления раствора poly(I:C) к раствору JetPEI, а не наоборот, или лиофилизации препаратов с использованием соединений, например, глюкозы или маннита в качестве наполнителя.

Однако такие детали сложно перенести от малых объемов для однократного или немедленного применения к препаратам в крупном масштабе соответствующих GMP фармацевтических составов, которые основаны на JetPEI в качестве носителя, содержат молекулы poly(I:C) в достаточно высокой концентрации (по меньшей мере 0,5 мг/мл) и характеризуются однородными концентрациями, которые необходимы для проведения исследования высоких доз во время фармако-токсикологической или другой доклинической оценки. Кроме того, стадия смешивания компонентов ВО-111 непосредственно перед введением позволяет специалисту получить конечный материал высокого качества, в частности, что касается образования прозрачных, а не мутных растворов, содержащих частицы ВО-111, характеризующихся диапазоном большого и не в полной мере контролируемого диаметра (размера).

В данном контексте цель следующей стадии заключалась в оценке различных средств и эффектов стандартизации на диаметр частиц смеси ВО-111. Исходный препарат ВО-111, который получали в 2 флаконах способом быстрого пипетирования, применяли для получения и сравнения альтернативных препаратов, в которых концентрация и/или размер растворенного вещества, такого как комплексы ВО-111, изменяли в растворе с применением обычных технологий, таких как центрифугирование при высокой скорости (например, выше 5000 rpm) и фильтрование (например, при размере пор в диапазоне 1-5 мкм или субмикромольном диапазоне).

Данный исходный анализ показал, что с помощью применения каких-либо технологий, полученные препараты ВО-111 характеризуются не только уменьшением среднего диаметра частиц ВО-111, но также неожиданным повышением цитотоксичности таких препаратов против раковых клеток, которая пропорциональна уменьшенному среднему диаметру комплексов ВО-111 (фиг. 1А). Такой увеличенный противораковый эффект также подтвердили в исследовании зависимости доза-эффект, которое показало, что профильтрованный раствор ВО-111, полученный с помощью фильтрования исходного раствора ВО-111 через поры с большим субмикромольным размером, характеризуется уже значимым усилением противораковых эффектов комплексов ВО-111, особенно при более низких концентрациях ВО-111 (фиг. 1В). Сходное увеличение цитотоксичности также подтверждали с использованием препаратов ВО-110, которые фильтровали через фильтр с размером пор 0,8 мкм.

Дополнительными критериями, которые можно оценивать, являются критерии, связанные с характеристиками JetPEI и соотношением в отношении молекул poly(I:C). На структурном уровне препараты JetPEI, в том числе линейный PEI в диапазоне средней молекулярной массы, исследовали с применением способа с 2 флаконами. Сравнение цитотоксичности таких препаратов ВО-111 (фиг. 2А) показало, что линейный PEI с более высокой молекулярной массой (например, от 17 до 23 кДа) обеспечивает получение противораковых препаратов ВО-111, которые более эффективны, чем те, которые содержат линейный PEI с более низкой молекулярной массой (например, 8,3 кДа).

В дополнение к определению диапазона размеров линейного PEI, подходящих для получения ВО-111, характеризующегося необходимыми противораковыми свойствами, исследовали эффект различного соотношения концентраций аминов PEI и анионного фосфата молекул poly(I:C) в контексте получения ВО-111. Ионный баланс между JetPEI и молекулами poly(I:C) может обеспечивать комплексы, которые характеризуются различным уровнем взаимодействий с клеточными компонентами (например, для эффективного проникновения в клетку). Данный баланс рассчитывали как соотношение N/P, определяющее количество азотных остатков JetPEI, которое приходится на фосфат полирибонуклеотида, при этом данная величина в отношении экспериментов *in vivo* доставки полирибонуклеотидов рекомендована в диапазоне от 6 до 8 (во избежание проблем токсичности больше 8, что соответствует 0,16 мкл JetPEI на 1 мкг двухнитевых молекул poly(I:C)). Отдельные препараты ВО-111 проявляли дозозависимый цитотоксический эффект как на клетки меланомы, так и нормальные меланоциты при увеличении такого соотношения N/P от 1,8 до 5,2. В действительности, только в промежуточном диапазоне (соотношение N/P около 3) цитотоксичность против клеток меланомы превосходила цитотоксичность против нормальных меланоцитов, при этом на жизнеспособность последних клеток только в малой степени влиял данный конкретный препарат ВО-111 по сравнению с необработанными клетками (фиг. 2В).

Препараты ВО-111 также анализировали на содержание молекул poly(I:C) с использованием партий меченых или немеченых poly(I:C). Исходная партия препарата poly(I:C) содержала двухнитевые молеку-

лы poly(I:C), которые вследствие их получения и их гибридизации характеризовались распределением по размеру до 5 тысяч оснований в длину (или более), при этом по меньшей мере 40 или 50% таких двухнитевых молекул характеризовались размером больше чем 0,85 т.о. и по меньшей мере 70% таких двухнитевых полирибонуклеотидов характеризовались размером, составляющим от 0,4 до 5 т.о. (в репрезентативном препарате <400 пар оснований (п.о.): 21%, 400-850 п.о.: 27%, 850-5000 п.о.: 52%). Если молекулы poly(I:C) связываются с JetPEI в комплексы в препаратах ВО-111 с применением способа с 2 флаконами, вся совокупность молекул poly(I:C) связывается с JetPEI, как показано с помощью анализа агарозного геля с немечеными или мечеными препаратами poly(I:C) (фиг. 3А и 3В). С помощью электрофореза также было определено, что в препаратах ВО-111 при соотношении N/P ниже 3 молекулы poly(I:C) не полностью связываются с JetPEI, как можно наблюдать при более высоком соотношении N/P (3 или выше; фиг. 3С). Таким образом, подходящий способ получения обеспечивает эффективное введение молекул poly(I:C) с широким распределением по размеру в биологические функциональные препараты ВО-111 без добавления конкретной процедуры для удаления не связанных в комплекс молекул poly(I:C) или JetPEI.

Структурные характеристики ВО-111 также оценивали путем применения технологий установления распределения частиц по размеру в субмикрометровом диапазоне, если способ получения повторяли или модифицировали или если препараты ВО-111 исследовали на их стабильность. Воспроизводимость данного способа получения демонстрировали при условии, что отдельные препараты ВО-111 всегда характеризовались мономодальным распределением частиц по размеру со значениями диаметра, которые в основном сосредоточены около 100 нм, наиболее часто от 50 до 90 нм (средний диаметр (d, нм) составлял 85-90 нм), со значительным большинством частиц с размером менее 100 или 200 нм, но не превышающим 400 нм, но обычно даже не превышающим 300 нм (фиг. 4А). Если данный эталонный препарат ВО-111 подвергали вариациям касательно температуры или времени инкубирования, распределение по размеру могло изменяться, но все еще оставалось мономодальным, при этом с максимальным значением от 100 до 150 нм (средний диаметр (d, нм) составлял 105-110 нм), со значительным большинством частиц все еще с диаметром менее 300 нм и не превышающим 600 нм (фиг. 4В и 4С). Соответствующие препараты ВО-111 все еще характеризовались сходным уровнем цитотоксичности при исследовании, описанном фиг. 1 и 2, демонстрируя, что данная процедура смешивания может обеспечивать составы, соответствующие требованиям фармацевтической разработки. Однако модификации данного способа, такие как понижение скорости смешивания или не включение процедур фильтрования, могут изменить распределение по размеру комплексов ВО-111, которое станет бимодальным, при этом с плохо контролируемым и большим средним размером (d, нм) и со значительным большинством частиц, превышающих 500 нм (фиг. 4D).

В данных экспериментах показано, что способ получения и составления комплекса, называемого ВО-110, можно улучшать с помощью применения быстрого и контролируемого смешивания компонентов в малом масштабе до их применения, что приводит к получению более однородного, концентрированного и эффективного препарата на основе poly(I:C), называемого ВО-111. Однако необходимы дополнительные улучшения для получения препаратов, представляющих полностью соответствующие GMP препараты, с более высокой стабильностью и характеристиками эффективности независимо от процедуры, устанавливаемой непосредственно перед медицинским применением. В частности, способ "быстрого пипетирования" или другие вариации способа с 2 флаконами могут по-прежнему обеспечивать значительное количество частиц, характеризующихся диаметром больше 200 нм (до 1 мкм или нескольких микрометров). Дополнительная (и возможно только отчасти эффективная) стадия фильтрования, которая может требоваться для обеспечения необходимых стерильных и концентрированных препаратов ВО-111 (характеризующихся функциональными комплексами с меньшим, распределенным в более узком диапазоне, однородным диаметром около 100 нм), может иметь последствие в потере большого количества материала, который остается на мембранном фильтре. Таким образом, даже если исходный подход позволил создать препараты ВО-111 в малом масштабе с обратно пропорциональной зависимостью между диаметром комплекса ВО-111 и его терапевтической активностью, требуются дополнительные технические улучшения для создания и смешивания растворов молекул poly(I:C) и JetPEI таким способом, чтобы он был удобным для получения партии соответствующих GMP стабильных фармацевтических составов, которые содержат комплексы на основе poly(I:C) с контролируемым распределением по размеру в более узком диапазоне и которые затем можно применять для получения нескольких флаконов, каждый из которых имеет содержимое с контролируемыми и сравнимыми характеристиками [такими как содержание poly(I:C), стабильность комплекса и виды биологической активности составов].

Пример 2. Способ получения препаратов ВО-11X в 1 флаконе в условиях GMP (состав на основе ВО-112).

Материалы и способы.

Получение препаратов ВО-112 (способ с 1 флаконом).

Препараты poly(I:C) получали в виде растворов, характеризующихся концентрацией, распределением молекул по размеру, и в соответствии с протоколом, как описано в примере 1. Однако в одной партии саму poly(I:C) получали с помощью следующего иллюстративного способа: раствор poly(C) нагревали

при температуре от 61 до 66°C в течение 1,5 ч перед смешиванием его с раствором poly(I) и перемешиванием при температуре от 55 до 58°C в течение 70 мин, после чего смесь охлаждали и фильтровали через мембрану 0,2 мкм. Некоторые условия, применимые на стадиях хроматографии и/или фильтрования, отсутствие или наличие стадии замораживания, а также буфер и время гибридизации адаптировали для дополнительного уменьшения вязкости раствора или осаждения комплексов. В конечном составе использовали в качестве наполнителя либо маннит, либо глюкозу. Раствор 1, содержащий JetPEI, получали либо путем использования JetPEI в концентрированном жидком препарате, либо путем солюбилизации твердых нерасфасованных препаратов JetPEI (характеризующихся молекулярной массой, составляющей от 17 до 23 кДа) в количестве стерильной воды для инъекции до достижения 150 мМ и смешивания с получением гомогенного раствора. Дополнительную стадию разбавления выполняли для достижения концентрации 11,25 мМ перед конечным разбавлением до 5,62 мМ в конечном флаконе. Раствор 2 содержал молекулы poly(I:C) и моногидрат глюкозы в количестве, которое после смешивания с JetPEI обеспечило раствор, образованный за счет добавления 5% глюкозы (вес/общий объем указанной композиции) и poly(I:C) при 0,5-0,7 мг/мл общего объема указанной композиции, следовательно, указанных комплексов poly(I:C) с указанным JetPEI, приводя таким образом к получению композиции BO-112, содержащей от 10^8 до 10^{10} частиц в растворе на флакон.

Растворы 1 и 2 независимо стерилизовали с применением двукратного фильтрования через фильтры 0,2 мкм (Sartopore® 2 150 0,2 мкм, полностью одобренные в качестве фильтров стерилизующего класса (согласно руководства ASTM F-838-05) с использованием насоса Watson Marlon (скорость 30 rpm). Автоматическое смешивание двух растворов выполняли в каждом флаконе с применением следующего последовательного способа: (i) раствор 1 добавляли во флакон с использованием насоса Watson-Marlow до достижения дозы 5,95-6,05 г (6 мл; плотность: 1 г/мл), (ii) раствор 2 добавляли к раствору 1 с использованием трубки с внутренним диаметром 1,8 мм, соединенной с иглой G20-0,9 мкм, с помощью насоса Flexicon при скорости 550 rpm до достижения дозы 6,08-6,40 г (6 мл). Результаты можно улучшить с применением Т-образной мешалки. В случае агрегатов из частиц (например, с размером в диапазоне 1-100 мкм или больше), которые все еще могут присутствовать при визуальном осмотре в конце процесса получения (или во время хранения продукта) по причине электростатических взаимодействий, продукт можно фильтровать через фильтр 0,8 мкм перед применением (например, перед его инъекцией), тем самым не изменяя ни биологические свойства, ни мономодальное распределение частиц по диаметру в композиции. Например, состав на основе BO-112 можно фильтровать через шприцевый фильтр Minisart (Sartorius) с размером отсева 0,8 мкм. Флаконы герметично укупоривали стерильными апиrogenными резиновыми пробками, обжимали с помощью алюминиевых крышек и по отдельности маркировали.

Коммерчески доступные poly(I:C)-содержащие составы.

Poly-ICI:C представляет собой препарат poly(I:C), который стабилизирован с помощью полилизина и карбоксиметилцеллюлозы (Ewel C. et al., 1992; WO 2005102278). LyoVec-HMW (кат. № tlr1-piclv) и LyoVec-LMW (кат. № tlr1-picwlv), а также соответствующие препараты poly(I:C) с высокой молекулярной массой (HMW; кат. название tlr1-pic) и низкой молекулярной массой (LMW; кат. название tlr1-picw) доступны от Invivogen.

Аналитические исследования.

Анализ диаметра и распределения BO-112 выполняли согласно примеру 1 с использованием стандартного оборудования для динамического рассеяния света.

Результаты.

Определение препарата BO-11X применяли к фармацевтическим композициям, которые получали путем смешивания соответствующим образом раствора, содержащего полимер, подобный PEI, с раствором, содержащим молекулы poly(I:C), для получения комплексов, характеризующихся частицами малого диаметра с распределением в узком диапазоне (как определено с помощью z-среднего диаметра с максимальным значением в диапазоне от 50 до 100 нм и не превышающего 300 нм, или даже 200 нм, как показано в примере 1). Если препараты BO-111 получены в результате стадии смешивания, которую выполняли вручную непосредственно перед дальнейшим применением (т.е. "способом с 2 флаконами"), то принимали во внимание связанные с GMP и другие промышленные требования (например, для автоматизации способа) для установления "способа с 1 флаконом", который предусматривает состав на основе BO-11X, соответствующий требованиям фармацевтических инструкций и готовый к инъекции. Для этой цели раздельно получали два раствора (а в случае раствора poly(I:C), включая также один или более наполнителей) и стерилизовали с помощью фильтрования перед смешиванием в автоматической системе, где скорость и время смешивания контролировали и поддерживали в отношении каждого флакона.

На фиг. 5А представлены общие сведения о таком способе получения первого типа препаратов BO-11X, которые названы составами на основе BO-112, где лекарственное вещество (т.е. двухнитевые молекулы poly(I:C), которые получены за счет гибридизации одноцепочечных молекул poly(I) и poly(C)), сперва смешивали с наполнителем, подобным глюкозе, в растворе, который стерилизовали с помощью фильтрования отдельно от раствора, содержащего полимер, что выполнял функцию носителя (т.е. JetPEI). Затем эти два нерасфасованных препарата соответствующим образом смешивали в каждом флаконе с получением большого количества структурно и функционально сравнимых фармацевтических

составов, которые необходимы для проведения фармако-токсикологических исследований и клинических применений.

Данный подход имеет преимущество в результатах, описанных в примере 1, и его можно автоматизировать для обеспечения препаратов ВО-112 с еще более однородными характеристиками. Данная процедура смешивания позволяет не только включать всю доступную глюкозу, JetPEI и молекулы poly(I:C) в комплексы в препаратах ВО-112 (фиг. 5B), но также модулировать средний диаметр комплексов и мономодальное распределение по диаметру комплексов в препаратах ВО-112 таким образом, чтобы z-средний диаметр можно было модулировать в диапазоне от 30 до 150 нм (фиг. 5C). Полученные препараты ВО-112 представляют собой комплексы ВО-112 с мономодальным распределением по диаметру без видимых частиц, даже если конечный раствор не фильтровали через 5 мкм фильтр после смешивания нерасфасованных растворов 1 и 2. Условия смешивания можно адаптировать, в частности, модифицируя скорость смешивания от 50 rpm до 600 rpm и/или скорость потока либо раствора poly(I:C), либо раствора JetPEI от 1 до 50 мл/мин.

В общем, препараты ВО-11X (и, в частности, препараты ВО-112) характеризуются следующими основными характеристиками: отсутствием цвета, отсутствием видимых частиц, осмолярностью, составляющей от 260 до 340 мОсм/кг, значением pH, составляющим от 2,7 до 3,4, оптическим вращением от +1500 до +3750, дзета-потенциалом, равным или превышающим 30 мВ, мономодальным распределением частиц по диаметру с z-средним диаметром (нм), составляющим от 30 до 150 нм, но предпочтительно от 60 до 130 нм, и содержанием молекул poly(I:C), где по меньшей мере 40 или 50% таких двухнитевых полирибонуклеотидов характеризуются размером больше 0,85 т.о. и по меньшей мере 70% таких двухнитевых полирибонуклеотидов характеризуются размером, составляющим от 0,4 до 5 т.о. Характеристики, такие как распределение частиц по диаметру, можно модифицировать за счет применения Т-образной мешалки в комбинации с различной скоростью потока как для раствора 1, так и для раствора 2. Если такая скорость превышает 20 мл/мин (например, 30 мл/мин), мутность полученного препарата ВО-112 уменьшается параллельно с уменьшением z-среднего диаметра частиц и распределением по диаметру в пределах данного значения, при сохранении мономодальности, возможно по причине изменения в режиме потока.

Иллюстративный препарат ВО-112 представляет собой композицию, сходную с ВО-111 (что образована из 6,924 мг poly(I:C), 5,625 mM JetPEI, 5% глюкозы), но каждый флакон содержит частицы с z-средним диаметром в диапазоне от 45 ± 5 до 81 ± 5 нм (например, 73 ± 5 нм), при этом по меньшей мере 50% частиц являются меньше 85 ± 20 нм, дзета-потенциал составляет 38 мВ и pH 3,1. Данные структурные свойства, которые сохраняются после цикла замораживания/оттаивания при -20°C или сильного воздействия при комнатной температуре, можно модифицировать в отдельных партиях, поддерживая критерии приемлемости в конкретных диапазонах значений (например, составы на основе ВО-112 могут характеризоваться z-средним диаметром 100 ± 50 нм (например, 89 нм) с потенциальным z, составляющим от приблизительно 40 до 45 мВ (например, 43 мВ). Данные значения можно модифицировать после криоконсервации, но они по-прежнему останутся в данных диапазонах.

По меньшей мере некоторые из таких критериев воспроизводимости и приемлемости можно сравнивать с таковыми других poly(I:C)-содержащих составов, которые, как известно, обладают противораковой активностью. На уровне размера молекул poly(I:C) молекулы poly(I:C), которые содержатся в коммерческих Lyovesc-NMW и Lyovesc-LMW, охватывают диапазоны размеров, которые явно отличаются от размеров согласно способу получения ВО-11X, в котором они фактически применяются (при этом NMW почти полностью составляет более 0,85 т.о. и LMW почти полностью составляет менее 0,85 т.о.; фиг. 6A). Данная разница размеров в молекулах poly(I:C) может зависеть от различных способов получения и/или носителя, который связан в комплексах с молекулами poly(I:C). Z-средние значения комплексов в комплексах на основе poly(I:C) в poly-ICI:C (содержащем полилизин и карбоксиметилцеллюлозу) и Lyovesc-NMW/Lyovesc-LMW (согласно производителю содержащих катионные реагенты на основе липидов для трансфекции дитетрадецилфосфорил-N,N,N-триметилметанаминийхлорид или DTCPTA и нейтральный липид 1,2-дифитаноил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин или DiPPE) сравнивали с одним из составов на основе ВО-112, при этом показано, что такие коммерческие составы содержат комплексы, которые намного крупнее (в значительном большинстве составляют более 200 нм) и, по меньшей мере, в отношении Lyovesc-LMW, характеризуются бимодальным распределением (фиг. 6B).

Если данный анализ выполняли после цикла замораживания/оттаивания, то данные коммерческие препараты оказывались также менее стабильными, при этом с вариабельностью, которая не наблюдалась в отношении ВО-112 (фиг. 7A-D). Действительно, если состав на основе ВО-112 характеризуется z-средним диаметром (d, нм) 100 ± 50 нм (например, 82,5 нм), и не превышающим 400 нм, как и составы на основе ВО-111 (см. фиг. 4 и 6B), составы на основе Lyovesc и Poly-ICI:C характеризуются z-средним значением намного больше 300 нм, таким образом подтверждая, что коммерчески доступные poly(I:C) представлены в виде препаратов, которые являются либо гетерогенными в композиции, либо включают крупные частицы, которые недостаточно охарактеризованы функционально и чей размер модифицируется в ходе цикла замораживания/оттаивания.

Гиперхромизм также можно применять для оценки состава на основе ВО-112 и, в частности, стабильности двухнитевых молекул poly(I:C) в частицах вследствие изменений в температуре (или другого условия), определяющих разделение нитей poly(I) и нитей poly(C). Состав на основе ВО-112 проявлял очень низкий гиперхроматический эффект с различиями в коэффициенте пропускания при 260 нм, составляющими менее 0,2 или 0,1. Также анализировали и подтверждали стабильность замороженных во флаконах ВО-11X при -20°C в течение различных периодов времени.

Фильтрация, лиофилизация и заморозка состава на основе ВО-112 перед введением не вызывают существенных модификаций цитотоксических свойств, стабильности или структурных характеристик частиц в композиции относительно первоначального состава на основе ВО-112. Например, в композициях сохраняются D90% менее 250 нм, дзета-потенциал от 40 до 50 мВ, гидродинамический диаметр с z-средним значением от 30 до 150 нм, совместимость с использованием глюкозы в качестве наполнителя, значения полидисперсности, составляющие от 0,1 до 0,6, и другие применимые критерии из Европейской фармакопеи.

Таким образом, препараты ВО-11X, такие как препараты ВО-112, представляют собой составы, которые характеризуются высоким уровнем стабильности и воспроизводимости в отношении частиц, образованных за счет комплексов poly(I:C)-JetPEI с z-средним диаметром (d, нм) менее 200 нм (если не менее 100 нм), чего не наблюдается в отношении коммерческих составов на основе poly(I:C), которые основаны на других носителях и способах получения.

Пример 3. Функциональная характеристика препаратов ВО-11X в клеточных моделях.

Материалы и способы.

Составы на основе poly(I:C).

Препараты poly(I:C) получали, как описано в примере 2.

Анализ клеточной жизнеспособности.

Клеточную линию меланомы человека SK-MEL-103 и клеточную линию рака поджелудочной железы человека PANC 02.03 использовали, как описано в примере 1 и литературе, указанной в настоящем документе, с применением составов на основе poly(I:C), которые содержат молекулы poly(I:C), при концентрациях в диапазоне от 0,3 до 2,5 мкг/мл (0,85 мкг/мл являлось наиболее релевантным эталонным значением) и при воздействии на клетки в течение периода времени, составляющего от 12 до 48 ч.

Активность индуцирования гибели ВО-112 исследовали в нормальных меланоцитах и клеточных линиях из меланомы и глиобластомы и сравнивали с выделенными компонентами, т.е. молекулами poly(I:C) и линейным PEI (Jet PEI; Polyplus). Нормальные меланоциты выделяли из крайней плоти доноров без симптомов. Клетки меланомы SK-Mel-28, SK-Mel-103 и UACC62 (с мутациями в p53, NRAS и BRAF соответственно) получали из созданных коллекций в ATCC или Мемориальном онкологическом центре Слоуна-Кеттеринга (США) и подвергали получению профилей коротких tandemных повторов (STR) (GenePrint® 10 System) для установления аутентичности клеточных линий. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (6000 клеток/луночка). При этом в трехкратной повторности на эксперимент с обработкой в течение 24 ч или 40 ч только poly(I:C), составом на основе ВО-110 или составом на основе ВО-112 при 0,5 или 1 мкг/мл.

Результаты.

В примерах 1 и 2 представлены экспериментальные данные в отношении исходной разработки и характеристики составов на основе ВО-11X, приводящих к увеличению цитотоксичности составов на основе ВО-11X против раковых клеток по сравнению с ВО-110. Эти данные можно дополнительно интегрировать путем сравнения способа получения ВО-11X и полученных poly(I:C)-содержащих препаратов со способами и препаратами, которые раскрыты в литературе.

В примере 2 показано, что коммерческие Lyovect-HMW и Lyovect-LMW характеризуются существенно отличающимися распределениями. Однако можно оценить, в какой степени различный размер молекул poly(I:C) в соответствующих препаратах HMW и LMW poly(I:C) может также влиять на активность комплексов, полученных с применением способа получения ВО-11X и HMW и LMW poly(I:C). Когда цитотоксическую активность состава на основе ВО-112 сравнивали с коммерческими составами, то последние оказались намного менее эффективными в отношении уничтожения раковых клеток по меньшей мере в двух моделях *in vitro* (фиг. 8А и В). Цитотоксическую активность ВО-11X можно измерять в различных типах линий раковых клеток, представляющих различные клинические показания рака, для оценки того, на какие показания рака более эффективно влияет обработка ВО-11X. Данные эффекты также можно изучать с помощью измерения экспрессии и/или секреции белков, которые, как известно, модифицируют и, возможно, усиливают клеточный ответ против раковых клеток. Например, состав на основе ВО-112 индуцирует намного более эффективно, чем Poly-ICI:C, экспрессию интерферона-β в клеточной линии меланомы на протяжении периода по меньшей мере 24 ч (фиг. 8С). Эти *in vitro* данные можно применять для оценки не только того, на какие типы рака более эффективно влияет обработка с помощью введения состава на основе ВО-11X, но также для оценки того, какие другие виды лечения рака (такие как вакцины, вспомогательные вещества, антитела, химиотерапевтические лекарственные средства, лучевая терапия, иммунотерапия или ингибиторы ферментативной активности, к примеру, киназ)

могут оказывать более эффективное действие в случае применения в комбинации с составом на основе BO-11X (например, путем уменьшения дозировки, частоты и/или периода обработки с помощью данного другого подхода).

Действительно, специфичность таких цитотоксических эффектов против линий раковых клеток, а не против нормальных первичных клеток, со стороны составов на основе BO-11X (как ранее описано для составов на основе BO-110 в лабораторном масштабе; Tormo D. et al., 2009) подтверждали *in vitro* путем сравнения активностей с таковыми соответствующих соединений и клеточными контролями (фиг. 9). Ни линейный PEI_L, ни молекулы poly(I:C) по-отдельности существенным образом не влияли на жизнеспособность опухолевых клеток (меланомы или глиомы). Только когда линейный PEI и молекулы poly(I:C) образовали комплекс, то наблюдали значительную гибель опухолевых клеток без влияния на жизнеспособность нормальных меланоцитов. Применяли сходные подходы с использованием клеток для проверки BO-11X, и состава на основе BO-112 в частности, которые подвергали фильтрованию, лиофилизации и/или замораживанию, подтверждающие, что цитотоксические эффекты, выраженные в качественной и количественной форме, сохраняются в препаратах BO-112 после таких процессов. Более глубокий анализ этих данных *in vitro* для управления клинической разработкой можно выполнять с использованием различных доклинических моделей, подразумевающих получение и сравнение различных составов на основе BO-11X, различных схем введения и/или состояний, ассоциированных с заболеванием, таким как рак.

Пример 4. Функциональная характеристика препаратов BO-11X в животных моделях.

Материалы и способы.

Составы на основе BO-11X и другие соединения.

Составы на основе BO-112 получали, как описано в примере 2, и разбавляли с помощью 5% раствора глюкозы в PBS (носитель; номер по каталогу: BE14-516F, Lonza, Франция) до трех различных концентраций в соответствии с количеством дозы на килограмм веса тела животного, соответственно, 0,05 мг/кг, 0,5 мг/кг и 2,5 мг/кг.

Мышиное антитело к PD-L1 (InVivoPlus, клон 10F.9G2) выбирали в качестве соединения для комбинированной иммунотерапии. В каждый день инъекции мыши антитело к PD-1 разбавляли с помощью носителя до конечных концентраций 1,5 мг/мл.

Результаты.

Противораковую эффективность *in vivo* состава на основе BO-112 исследовали *in vivo* у мышей иммунокомпетентной породы, которым имплантировали клетки меланомы мыши. Мышей обрабатывали либо раствором PBS, либо составом на основе BO-112 в трех различных концентрациях (0,05, 0,5 или 2,5 мг/кг, предпочтительно вводимыми интратуморально) в комбинации с мышиным антителом к PD-L1 (предпочтительно вводимым внутривенно) и сравнивали с носителем отдельно на протяжении 3 недель (фиг. 10A). Антитело к PD-L1 в комбинации с носителем не существенно увеличивало выживаемость по сравнению с носителем отдельно. Все три комбинации составов на основе BO-112, исследованные с антителом к PD-L1 (и возможно независимо от такого антитела), существенно увеличивали выживаемость мышей по сравнению с носителем или антителом к PD-L1 по-отдельности. Кроме того, выживаемость существенно увеличивалась в случае комбинации 2,5 мг/кг состава на основе BO-112 + антитело к PD-L1 по сравнению с более низкими дозами состава на основе BO-112. Данные результаты коррелировали с измеренными размерами опухолей в данных группах.

Антитело к PD-L1 является важным и одобренным противораковым лекарственным средством и медиатором эффективного иммунного ответа против раковых клеток. В эксперименте исследователей продемонстрировано, что комплексы BO-11X можно применять в комбинации с другими противораковыми средствами, и что комбинация соединений BO-11X с другими противораковыми средствами, такими как антитело к PD1, характеризуется превосходящей эффективностью по сравнению с противораковым средством отдельно, что приводит к существенному увеличению показателей выживаемости и противоопухолевой эффективности. Кроме того, улучшение выживаемости коррелирует с увеличением дозы состава на основе BO-11X в комбинации, подтверждая то, что дополнительное преимущество в выживаемости опосредовано составом на основе BO-11X.

Таким образом, составы на основе BO-11X можно применять (отдельно или в комбинации с другими противораковыми средствами, такими как антитела, средства иммунотерапии или химиотерапии, которые можно вводить с использованием того же или отличающегося пути) в лечении меланомы и других показаний рака, в частности тех, которые обеспечивают возможность перитуморальной или интратуморальной инъекции, таких как рак поджелудочной железы, эндометрия, яичника или колоректальный рак. Для этой цели идентификация конкретных биологических путей и механизмов действия может определять наиболее соответствующие дозировки, схемы лечения, комбинацию с другими лекарственными средствами или видами терапии, и показания для составов на основе BO-11X, как показано для комбинированных эффектов иммуномодулирующих моноклональных антител, нацеливающихся на PD-1 или CD137, и poly(I:C), которые усиливают активность дендритных клеток (Sanchez-Paulete A.R. et al., 2015). В связи с этим, в Duewell P. et al., 2015 раскрыта альтернативная животная модель заболевания, которую можно применять для исследования композиции по настоящему изобретению.

Терапевтический эффект BO11X на опухолевый рост (местно и/или в отдаленных локализациях) и

противоопухолевый иммунный ответ можно измерять с помощью проведения исследований *in vivo* интратуморального (*i.t.*) введения в диапазоне концентрации молекул poly(I:C) (такой как 0,5, 1, 2, 2,5 или 5 мг/кг) для оценки, насколько такая обработка улучшает выживаемость мышей в релевантной модели, такой как мышьяная модель меланомы, при совместном введении с дополнительным лекарственным средством или вакциной или без них. В то же время исследования дозозависимого эффекта в отношении конкретных видов биологической активности, индуцируемых обработкой с помощью ВО-11X, можно оценивать параллельно *ex vivo* с использованием образцов от человека или животного на уровне индуцирования апоптоза (с помощью излучения, связанного с каспазой), секреции хемокина/цитокина в биологической текучей среде (например, секреции IL-6 и IP-10), клеточной активации и/или пролиферации *in vitro* (например, ассоциированной с повышенной регуляцией CD40, CD86, CD69 в релевантных типах клеток). Данные исследования можно выполнять с использованием клеток, которые непосредственно вовлечены в заболевание (например, опухолевая клетка, эпителиальная клетка, эндотелиальные или эпителиальные клетки) или вовлечены опосредованно, поскольку проявляют некоторые виды иммунной или иммунорегуляторной активности (например, моноклеарные клетки периферической крови человека, NK-клетки, В-клетки, CD4+/CD8+ Т-клетки, дендритные клетки). Данные исследования могут быть дополнительно связаны с идентификацией молекул, которые можно использовать в качестве биологического маркера, чтобы прогнозировать ответ на ВО-11X (или его отсутствие) для разделения стадий заболевания и/или популяций пациентов в отношении обработки ВО-11X.

Список литературных источников

- Ammi R et al., 2015. *Pharmacol. Ther.*; 146:1 20-31.
- Amos SM et al., 2011. *Cancer Immunol. Immunother.*; 60: 671-83.
- Bald T et al., 2014. *Cancer Discov.*; 4: 674-87.
- Bhoopathi P et al., 2014. *Cancer Res.*; 74: 6224-35.
- Bilensoy E, 2010. *Expert Opin. Drug Deliv.*; 7: 795-809.
- Chen L et al., 2013. *Int. J. Nanomed.*; 8:137-145.
- Chiba Y et al., 2013. *PLoSOne.*; 8: e76159.
- Cho K. et al., 2016, *Immunobiology*. pii: S0171-2985(16)30359-X. doi: 10.1016/j.imbio.2016.08.012.
- Cobaleda-Siles M et al., 2014. *Small.*; 10: 5054-67.
- Duewell P et al., 2015., *OncolImmunol.*; 4(10): e1029698.
- Ewel C et al., 1992. *Cancer Res.*; 52: 3005-10.
- Fujimura T et al., 2006. *Eur. J. Immunol.*; 36: 3371-80.
- Galluzzi L et al., 2014. *Oncotarget*; 5: 12472-508.
- Garcia-Pascual C and Gomez R, 2013. *J. Endometr.*; 5(suppl.1):S13 (SP-04).
- Germershaus O and Nultsch K, 2015. *Asi J Pharm Sci.* 10: 159-175.
- Gupta S et al. 2016. *Tumor Biol.* 37: 12089–12102.
- Hafner A et al., 2013. *Advanced Drug Delivery Rev.*; 65 (10): 1386-1399.
- Ho V et al., 2015. *Oncotarget*. 6: 27252–27266).
- Islam M et al., 2014. *Journal of Controlled Release*; 193: 74-89.

- Kabilova T et al., 2014. BMC Cancer.; 14: 338.
- Keir M et al., 2008. Annu. Rev. Immunol.; 26: 677-704.
- Kübler K et al., 2011. Eur. J. Immunol.; 41: 3028-39.
- Kurosaki T et al., 2009. Biomaterials, 30: 2846-2853.
- Le U et al., 2008. Canc. Biol. Ther.; 7: 440-447.
- Le U et al., 2009. Radiother. Oncol.; 90: 273-279.
- Levitzki A, 2012. Front. Oncol.; 2: 4.
- Matijević T et al., 2011. Chemotherapy; 57: 460-7.
- McBain S et al., 2007. J. Mater. Chem.; 17: 2561-2565.
- Nagato T and Celis E, 2014. Oncoimmunology; 3: e28440.
- Ohashi T et al., 2013. Int. J. Cancer; 133: 1107-18.
- Palchetti S et al., 2013. RSC Adv.; 3: 24597-24604.
- Perrot I et al., 2010. J. Immunol. 185:2080-2088.
- Pozuelo-Rubio M et al., 2014. Nano-Oncologicals in Adv. Del. Sci. Tech., Springer, pp. 453-470.
- Saheki A et al., 2011. Int. J. Pharm.; 406: 117-21.
- Sajadian A et al., 2014. Arch. Virol.; 159: 1951-1960.
- Sanchez-Paulete AR et al., 2015. Cancer Discov.; pii: CD-15-0510.
- Schaffert D et al., 2011. Pharm. Res., 28: 731-741.
- Shabani M et al., 2010. Avicenna J. Med. Biotech.; 2: 123-130.
- Storz U, 2011. MAbs.; 3: 310-7.

Szabo A et al., 2012. Melanoma Res.; 22: 351-361.

Taura M et al., 2010. Cancer Sci.; 101: 1610-7.

Tormo D et al., 2009. Cancer Cell; 16: 103-114.

Tutin-Moeavin I et al., 2015. Org & Biomol Chem. 13: 9005-9011.

Vacchelli E et al., 2013. Oncoimmunology; 2: e25396, e23510, e25595.

Van der Jeught K et al., 2015. Oncotarget; 6: 1359-81.

Vega-Letter A et al., 2016. Stem Cell Res. & Ther. 7:150

Yoshino H and Kashiwakura I, 2013. Blood; 122: 4721.

Yu L et al., 2016. Immunol Cell Biol. 94:875-885.

Zhang Y et al., 2014. Cancer Lett. 355: 76-84.

Zhou Y et al., 2013. Innate Immun.; 19: 184-192.

WO2004045491.

WO2005102278.

WO2011003883.

Remington's Pharmaceutical Sciences (edited by Allen, Lloyd V., Jr; 22nd edition, 2012).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая водная композиция для лечения рака, содержащая частицы, где

(а) каждая частица содержит комплекс по меньшей мере из одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и по меньшей мере одного полиалкиленимина или его соли и/или сольвата, где

(i) двухнитевой полирибонуклеотид представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)],

где по меньшей мере 60% двухнитевых полирибонуклеотидов имеют по меньшей мере 850 пар оснований, по меньшей мере 70% двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 5000 пар оснований и от 20 до 45% двухнитевых полирибонуклеотидов имеют от 400 до 850 пар оснований; и

(ii) полиалкиленимин содержит по меньшей мере 95% линейных полиэтилениминов, где средняя молекулярная масса линейного полиалкиленимина составляет от 17 до 23 кДа и коэффициент полидисперсности составляет <1,5, и

где соотношение количества молей азота полиалкиленимина и количества молей фосфора двухнитевого полирибонуклеотида в композиции составляет от 2,5 до 3,5; и

(b) частицы характеризуются z-средним диаметром, измеренным согласно ISO 22412, составляющим от 30 до 150 нм.

2. Композиция по п.1, где по меньшей мере 99% частиц характеризуются мономодальным распределением по диаметру менее 600 нм.

3. Композиция по п.1, где композиция характеризуется дзета-потенциалом, составляющим от 35 до 50 мВ.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где по меньшей мере 95% частиц имеет диаметр меньший или равный 400 нм.

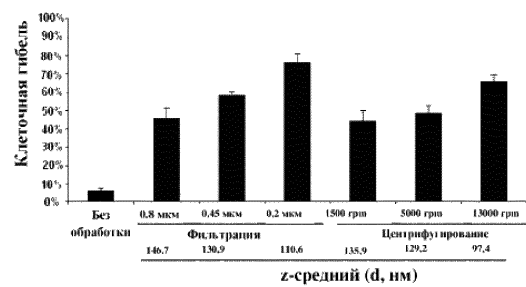
5. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где композиция на основе полирибонуклеотида содержит полиинозиновую-полицитидиловую кислоту [poly(I:C)] в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5 мг/мл.

6. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество.

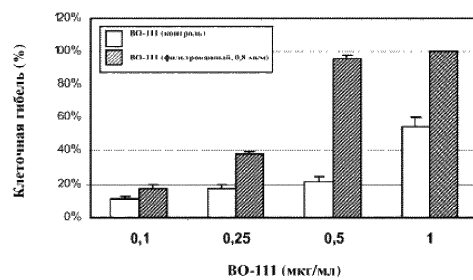
7. Композиция по п.1, где композиция дополнительно содержит глюкозу или маннит в концентрации, составляющей от 1 до 10% вес./об. композиции.

8. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где композиция дополнительно характеризуется
 - (a) показателем pH, составляющим от 2 до 4; и/или
 - (b) осмоляльностью, составляющей от 200 до 600 мОсм/кг.
9. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где композиция образована путем получения комплекса по меньшей мере из 0,5 мг полиинозиновой-полицитидиловой кислоты [poly(I:C)] на 1 мл общего объема композиции.
10. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где композиция образована путем дополнительного добавления глюкозы или маннита в концентрации, составляющей от 1 до 10% вес./об. композиции.
11. Фармацевтическая композиция для лечения рака, полученная путем лиофилизации фармацевтической водной композиции по любому из предыдущих пунктов.
12. Применение фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов в качестве лекарственного препарата в лечении рака, где лекарственный препарат представляет собой инъекционную водную композицию.
13. Применение по п.12, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество.
14. Применение по п.12, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит иммуномодулирующее средство, нацеленное на один или более из PD-1, PD-L1 и PD-L2, предпочтительно где иммуномодулирующее средство представляет собой ингибитор PD-1, такой как антитело к анти-PD-1.
15. Применение по любому из пп.12-14, где фармацевтическая композиция вводится системно, или посредством интратуморальной или перитуморальной инъекции, или посредством инъекции в кожу, или во внутренний орган, или в ткань.
16. Применение по п.12 или 13, где рак представляет собой солидный рак, выбранный из карциномы, глиомы, меланомы или саркомы.
17. Применение по п.12 или 13, где рак вызван повторным ростом опухоли, метастазированием в легкие или метастазированием в печень.
18. Применение по п.12 или 13, где указанный рак представляет собой рак I, или II, или III, или IV стадии.
19. Применение по любому из пп.12-18, где указанная фармацевтическая композиция вводится в комбинации с лучевой терапией, химиотерапией, криотерапией, абляцией опухоли, фотодинамической терапией или иммуномодулирующим средством.
20. Применение по п.19, где указанное введение является одновременным или последовательным, в любом порядке или в последовательных циклах введения.
21. Применение по п.19 или 20, где указанное иммуномодулирующее средство выбрано из анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-PD-L2, анти-CTLA-4 и анти-CD137.
22. Применение по п.21, где указанная фармацевтическая композиция уменьшает побочные эффекты иммуномодулирующего средства, выбранного из анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-PD-L2, анти-CTLA-4 и анти-CD137.
23. Применение по п.21, где указанный рак является резистентным к иммуномодулирующему средству, выбранному из анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-PD-L2, анти-CTLA-4 и анти-CD137.
24. Способ получения фармацевтической водной композиции по любому из пп.1-11, включающий:
 - (a) обеспечение (i) водного раствора по меньшей мере одного двухнитевого полирибонуклеотида или его соли или сольвата и (ii) водного раствора по меньшей мере одного линейного полиалкиленимина или его соли или сольвата, где один из растворов или оба из них необязательно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, органический растворитель, наполнитель и/или вспомогательное вещество;
 - (b) фильтрование каждого соответствующего водного раствора стадии (a) независимо через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 500 нм, с образованием соответствующего стерилизованного раствора;
 - (c) смешивание каждого соответствующего полученного стерилизованного раствора в смесительной камере с образованием водной композиции по п.1 путем одновременного добавления каждого соответствующего стерилизованного раствора в смесительную камеру необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин, или путем последовательного добавления одного стерилизованного раствора в другой стерилизованный раствор в смесительной камере необязательно путем впрыскивания при скорости, составляющей более или равной 1 мл/мин.
25. Способ по п.24, дополнительно включающий:
 - (d) фильтрование полученной на стадии (c) водной композиции через фильтр с диаметром пор, составляющим менее или равным 600 нм, с образованием фильтрата или центрифугирование полученной водной композиции при ускорении, составляющем более или равном 22480 м/с^2 , с образованием надосадочной жидкости; и необязательно
 - (e) осуществление лиофилизации полученных водной композиции, фильтрата или надосадочной жидкости.

А)

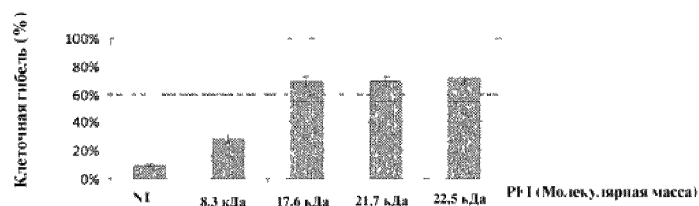


В)

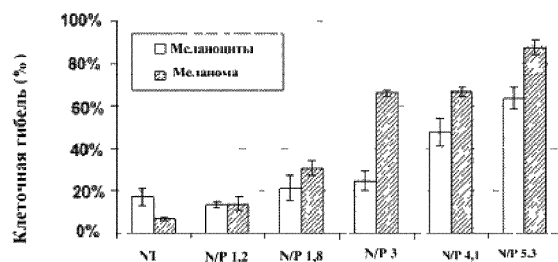


Фиг. 1

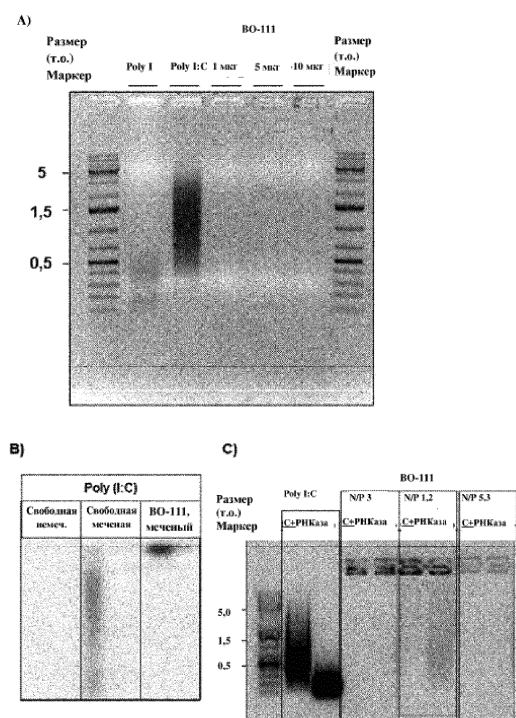
А)



В)

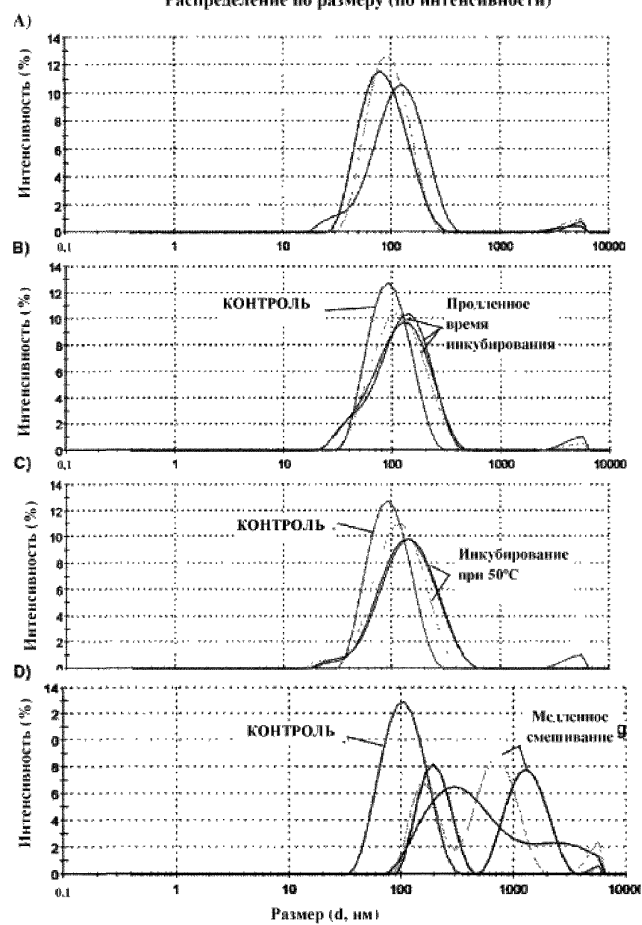


Фиг. 2

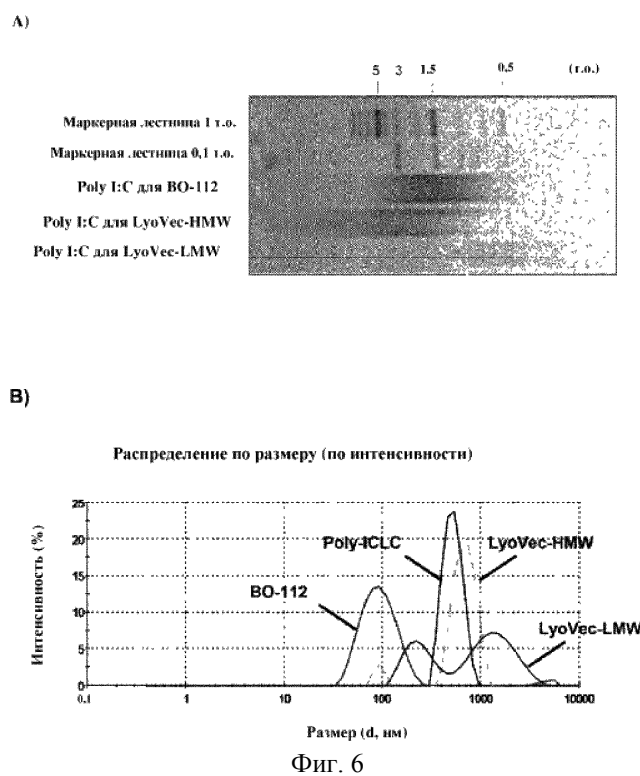
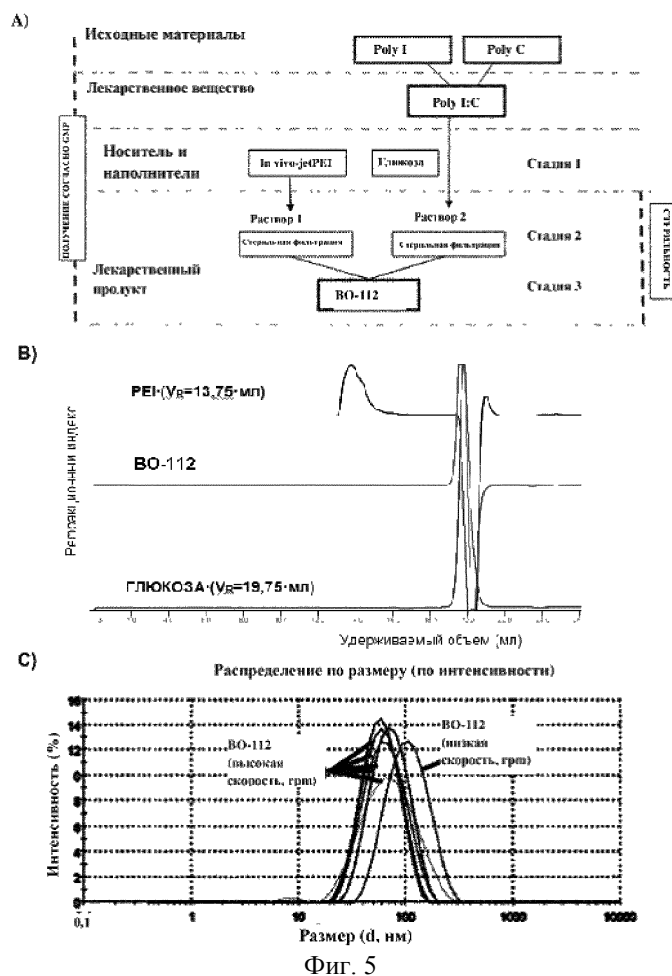


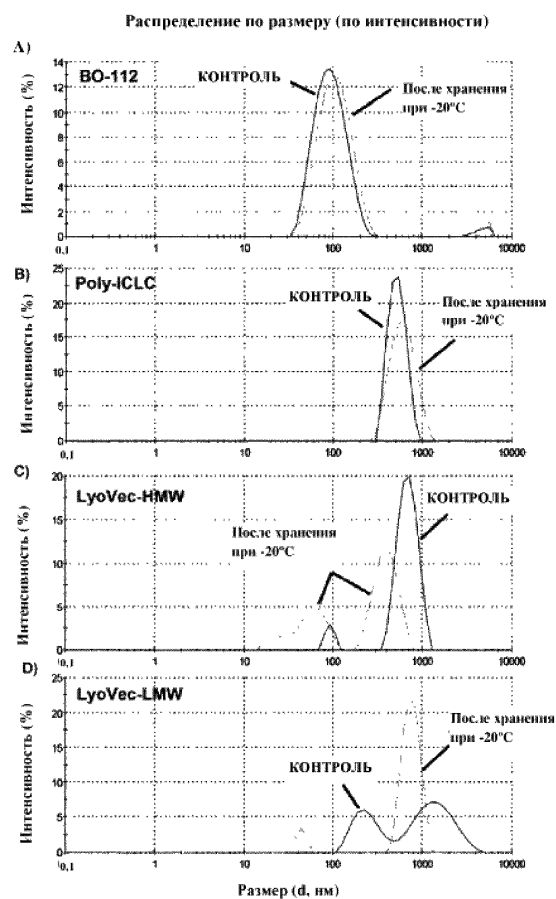
Фиг. 3

Распределение по размеру (по интенсивности)

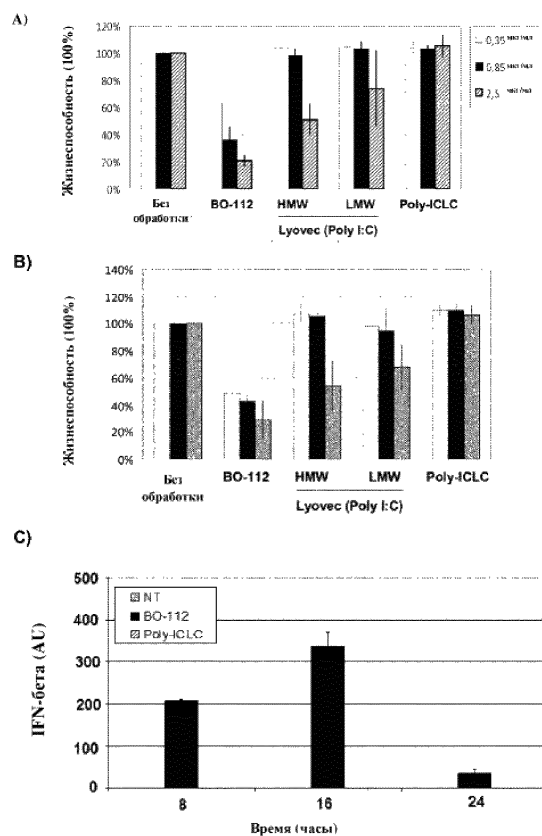


Фиг. 4

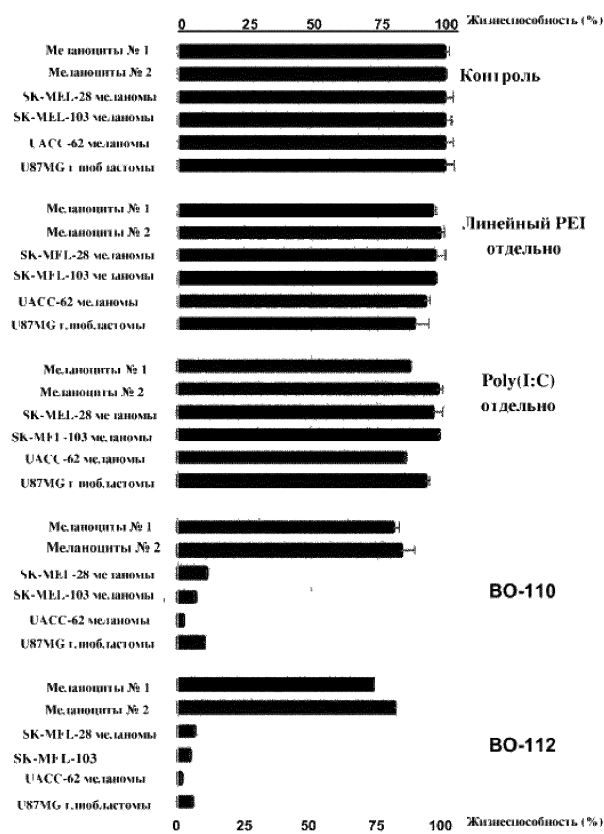




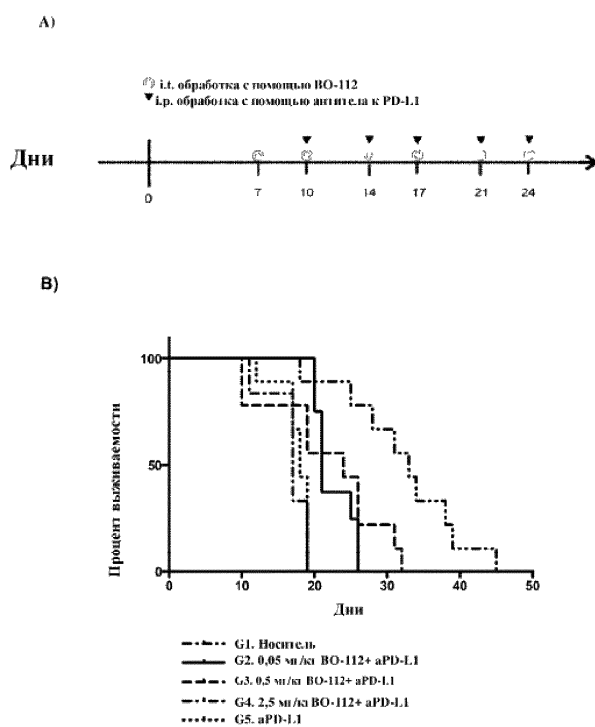
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2