



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.29

(21) Номер заявки
201792560

(22) Дата подачи заявки
2016.05.27

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)
A61N 5/10 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

(31) EP15305810.2

(32) 2015.05.28

(33) EP

(43) 2018.06.29

(86) PCT/EP2016/061989

(87) WO 2016/189125 2016.12.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НАНОБИОТИКС (FR)

(72) Изобретатель:
**Марилл Жюли, Поттье Аньес, Леви
Лоран (FR)**

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

(56) LAURENCE MAGGIORELLA ET AL:
"Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide
nanoparticles", FUTURE ONCOLOGY, FUTURE
MEDICINE LTD., LONDON, GB vol. 8,
no. 9 1 September 2012 (2012-09-01), pages
1167-1181, XP002698557, ISSN: 1479-6694,
DOI: 10.2217/FON.12.96 Retrieved from the
Internet: URL: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon.12.96> Materials; page 1168 page
1175

EP-A1-2130553
XIAO-DONG ZHANG ET AL: "Size-
dependent radiosensitization of PEG-coated
gold nanoparticles for cancer radiation

therapy", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE
PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 33, no.
27, 21 May 2012 (2012-05-21), pages 6408-6419,
XP028401100, ISSN: 0142-9612, DOI:10.1016/
J.BIOMATERIALS.2012.05.047[retrieved on
2012-05-24]abstract page 6409, paragraph 2.1 page
6410, paragraph 3.2

WO-A1-2013087920

LISSETT R BICKFORD ET AL: "Silica-
gold nanoshells as potential intraoperative molecular
probes for HER2-overexpression in ex vivo breast
tissue using near-infrared reflectance confocal
microscopy", BREAST CANCER RESEARCH
AND TREATMENT, KLUWER ACADEMIC
PUBLISHERS, BO, vol. 120, no. 3, 6 May 2009
(2009-05-06), pages 547-555, XP019787443, ISSN:
1573-7217 the whole document

NATALIE PRAETORIUS ET AL:
"Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy",
RECENT PATENTS ON DRUG DELIVERY &
FORMULATION, vol. 1, no. 1, 1 February 2007
(2007-02-01), pages 37-51, XP055107945, NL ISSN:
1872-2113, DOI:10.2174/187221107779814104 page
39

NANOBIOTIX: "Release/Nanobiotix starts
clinical trial with lead product NBTXR3", INTERNET
CITATION, 13 September 2011 (2011-09-13),
XP002671267, Retrieved from the Internet: URL:
<http://www.nanobiotix.com/news/release/nanobiotix-starts-clinical-trial-with-lead-product-nbtxr3/>
[retrieved on 2012-03-12]the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к области здоровья человека и, более конкретно, касается способа лечения злокачественных новообразований за счет абскопального эффекта путем промотирования иммуногенной гибели злокачественных клеток у пациента, представляющего собой человека, страдающего обширным метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, пациента, представляющего собой человека, страдающего обширным метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого лучевая терапия была прекращена, или пациента, представляющего собой человека, страдающего обширным метастазирующим злокачественным новообразованием, которого не подвергают лечению посредством лучевой терапии, или пациента, представляющего собой человека, страдающего гемобластомом.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области здоровья человека, и, более конкретно, касается наночастиц для применения в качестве терапевтической вакцины, самостоятельно или включенными в композицию, в контексте лучевой терапии, проводимой индивидууму, страдающему злокачественным новообразованием, в частности метастазирующим злокачественным новообразованием или гемобластомом. Наночастицы, применение которых представлено в настоящем описании, состоят из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25. Каждая наночастица покрыта биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости. При облучении эти наночастицы способны усиливать деструкцию злокачественных клеток благодаря оптимизированной стимуляции иммунной системы самого индивидуума по сравнению с деструкцией злокачественных клеток, достигаемой при лучевой терапии в отдельности, в частности, у индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, предпочтительно индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, и индивидуума, страдающего гемобластомом. Благодаря настоящему изобретению дозы облучения, которому подвергают индивидуума в контексте лучевой терапии, предпочтительно в контексте фракционированной лучевой терапии, являются значительно более эффективными в отношении деструкции злокачественных клеток без повышения неблагоприятного воздействия на окружающую здоровую ткань. Кроме того, в настоящем описании представлены новые композиции и наборы, а также их применение.

Уровень техники

Злокачественные новообразования являются основной причиной смерти по всему миру, обуславливающей 8,2 миллионов случаев смерти в 2012 году. Ожидается, что ежегодное количество случаев злокачественных новообразований возрастет с 14 миллионов в 2012 году до 22 в течение следующих двух десятилетий (по данным ВОЗ). Злокачественное новообразование может развиваться локально и/или распространяться системно лимфогенным или гематогенным путем.

Хирургическое вмешательство, лучевая терапия и фармацевтические средства, в частности химиотерапевтические лекарственные средства, имеют основное значение в лечении злокачественных новообразований, и каждый из этих способов можно использовать в отдельности или в комбинации для воздействия на все участки, в которых может развиваться заболевание, в зависимости от типа злокачественного новообразования, подвергаемого лечению. Злокачественное новообразование, подлежащее лечению, необходимо контролировать на местном и системном уровнях.

Несмотря на недавние успехи в определении и лечении некоторых злокачественных новообразований, метастазирование остается распространенным, и на его долю приходится приблизительно 80-90% случаев смерти от злокачественных новообразований. Стандартным лечением метастазирующего заболевания у большинства пациентов со злокачественными новообразованиями является системная цитотоксическая химиотерапия и гормональная депривация (Dhara M. MacDermed et al., Journal of Surgical Oncology 2008). Существует насущная потребность в разработке новых способов радикальной терапии для лечения пациентов с метастазирующим злокачественным новообразованием.

Некоторые конкретные опухоли/злокачественные новообразования обладают свойством распространяться в определенные органы. Наиболее распространенными участками метастазирования являются легкие (например, если первичным злокачественным новообразованием является саркома), печень (например, если первичным злокачественным новообразованием является злокачественное новообразование желудочно-кишечного тракта), кости (например, если первичным злокачественным новообразованием является рак молочной железы или рак предстательной железы) и головной мозг (например, если первичным злокачественным новообразованием является рак легких, рак почки или меланома).

Лучевая терапия является вторым из наиболее используемых способов лечения злокачественных новообразований, предшествующим фармацевтическими средствами, при этом приблизительно половине всех пациентов с недавно диагностированными злокачественными новообразованиями проводят лучевую терапию в какой-то момент в ходе лечения их заболевания. В лучевой терапии используют частицы высоких энергий или волны, такие как рентгеновское излучение, гамма-излучение, пучки электронов или протоны, для разрушения или повреждения злокачественных клеток.

При терапевтическом использовании локального ионизирующего излучения в значительной степени руководствуются стратегией, направленной на достижение эффективного удаления злокачественных клеток. Лучевая терапия в качестве единственного терапевтического воздействия может обеспечить возможность функционального сохранения органа, например, в отношении рака мочевого пузыря и гортани. В качестве адьювантной терапии лучевая терапия может облегчать резекцию при ее использовании перед хирургическим вмешательством или способствовать лечению микроскопического остаточного заболевания при ее использовании после хирургического вмешательства, такому как лечение после лампэктомии с сохранением молочной железы. Новой разработкой является использование стереотаксической

лучевой терапии (SBRT) для абляции участков олигометастатического заболевания. SBRT делает возможным в значительной степени фокальное лечение злокачественного новообразования с использованием одной фракции или малого количества фракций излучения высокой энергии (как правило, от 5 до 25 Гр). Существование олигометастатического состояния основано на "промежуточном состоянии между четко локализованными повреждениями и обширными метастатическими повреждениями". Как правило, в случае SBRT рассматривают от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5, метастазов или очагов метастазирования (Dhara M. MacDermed et al., *Journal of Surgical Oncology* 2008; Ralph R. Weichselbaum *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011).

Однако метастазирующие злокачественные новообразования со множеством отдаленных метастазов (как правило, более 5, предпочтительно более 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 метастазов) ассоциированы с неблагоприятным прогнозом (Ralph R. Weichselbaum *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011).

Как правило, онкологи не рассматривают пациентов с распространенными системными заболеваниями (пациентов, у которых наблюдают множество метастазов, также идентифицируют как "полиметастатических" пациентов) в качестве пациентов, излечимых с помощью существующей региональной терапии, такой как лучевая терапия. С другой стороны, паллиативную лучевую терапию используют для временного облегчения симптомов, и она отличается от лучевой терапии, проводимой в качестве радикального лечения (Sonam Sharma et al., *Seminars in Oncology* 2014). Паллиативная лучевая терапия представляет собой эффективное лечение многих симптомов местнораспространенных или метастазирующих опухолей даже в случае пациентов с небольшой ожидаемой продолжительностью жизни (Sonam Sharma et al., *Seminars in Oncology* 2014). В этом случае лучевая терапия может представлять собой эффективное лечение боли, неврологических симптомов, облегчение обструктивных симптомов (таких как обструкция желчных протоков или мочевыводящих путей) и кровотечения или очагов изъязвления. Паллиативную лучевую терапию также можно использовать для поддержания локального контроля опухоли в области, которая, вероятно, будет повреждена и станет симптоматической. Типичными схемами фракционирования дозы при паллиативной лучевой терапии являются следующие схемы:

1×8 Гр, 5-6×4 Гр, 10×3 Гр в случае неосложненных метастазов в костях, в течение от 1 дня до 2 недель;

5×4 Гр, 10×3 Гр, 15×2,5 Гр в случае лучевой терапии всего головного мозга, в течение от 1 до 3 недель;

2×7,5-8,5 Гр, 10×3 Гр, 15×2,5 Гр в случае злокачественного новообразования на поздней стадии в легких, вызывающего обструкцию дыхательных путей, синдрома верхней полой вены, в течение от 1 до 3 недель;

1×8-10 Гр, 5×4 Гр, 10×3 Гр, 15-30×2-3 Гр в случае метастазов внутренних органов, вызывающих боль, симптомов обструкции, кровотечения, в течение от 1 дня до 6 недель;

1-5×6-24 Гр в случае стереотаксической лучевой терапии, как правило, принятой для пациентов с хорошим общим состоянием, длительным ожидаемым прогнозом и/или малым количеством метастазов, в течение от 1 до 5 дней (Sonam Sharma et al., *Seminars in Oncology* 2014, табл. 3).

Кроме того, имеющиеся доказательства позволяют предполагать, что локальное облучение в клинически терапевтических дозах вызывает некоторую активацию врожденного и приобретенного иммунитета. Показано, что облучение индуцирует иммуногенную гибель клеток (ICD), потенциально преобразующую опухоль в вакцину *in situ*, в частности, отличающуюся тремя молекулярными сигналами, способствующими захвату умирающих клеток дендритными клетками, перекрестному презентированию антигенов опухолевого происхождения Т-клеткам и активации противоопухолевых Т-клеток, включая активацию цитотоксических CD8+ Т-клеток: экспонирование кальретикулина (CRT) на поверхности опухолевых клеток, высвобождение белка группы с высокой подвижностью В1 (HMGB1) и высвобождение АТФ (Oliver Kepp et al., *Oncoimmunology* 2014).

Также известно, что ответ опухоли на облучение включает повреждение ДНК и то, что распознавание ДНК опухолевого происхождения может запускать продукцию ИФН и вызывать противоопухолевые Т-клеточные ответы на иммуногенные опухоли (см., например, Theresa L. Whiteside et al., 2016).

Радиация является комплексным модификатором микроокружения опухоли, и изредка ее самой достаточно для индукции терапевтически значимого противоопухолевого иммунного ответа, так как она также может активировать иммунный супрессорный путь, нанося вред. Доля опухолевых клеток, подвергающихся ICD и ремоделирующая микроокружение опухоли после облучения, является непостоянной. Состояние этого баланса в конечном итоге определяет способность облучения преобразовывать умирающие злокачественные клетки в эффективную вакцину *in situ* (Sandra Demaria and Silvia C. Formenti, 2012).

Показано, что комбинации облучения и иммунотерапевтических средств стимулируют иммунный ответ. Цитокины [интерлейкин-2 (ИЛ-2) и интерферон-альфа (ИФН α)] десятилетиями используют в качестве терапевтического подхода. В настоящее время в стадии разработки находятся многочисленные стратегии преодоления иммунной эвазии опухоли. Примеры иммунотерапевтических подходов, находящихся на стадии клинической оценки, включают (1) ингибиторы Т-клеточных контрольных точек или

агонистов пути активации Т-клеток, (2) новые цитокины, такие как ИЛ-12 и ИЛ-15, (3) терапевтическую вакцину, (4) удаление иммуносупрессорных клеток и (5) другие средства и подходы, созданные для усиления функционирования иммунных клеток (Scott J. Antonia et al., 2014; Theresa L. Whiteside et al., 2016).

Однако получение эффективных терапевтических вакцин остается затруднительным. Чтобы быть эффективными, вакцины для лечения злокачественных опухолей должны достигать две цели. Во-первых, они должны стимулировать специфические иммунные ответы против правильных клеток-мишеней (т.е. злокачественных клеток). Во-вторых, иммунные ответы должны быть достаточно мощными для преодоления барьеров, используемых этими клетками для своей защиты от атаки иммунной системы хозяина, как правило, В-клетками и естественными киллерными Т-клетками.

Сущность изобретения

Далее в настоящем описании авторы настоящего изобретения описывают предпочтительное применение наночастицы и/или агрегата наночастиц в качестве терапевтической вакцины, самостоятельно или включенными в композицию (как правило, являющуюся терапевтической композицией, в частности вакцинной композицией), в отношении индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием и подвергаемого лучевой терапии. Наночастица и/или агрегат наночастиц, а также композиция, содержащая наночастицу и/или агрегат наночастиц, как правило, предназначены для применения для лечения злокачественных новообразований. Комбинация таких наночастиц с лучевой терапией значительно усиливает противоопухолевый иммунный ответ хозяина и оптимизирует общее лечение, в частности, в контексте фракционированной лучевой терапии, включающей по меньшей мере одну стадию облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 20 Грей (Гр), как правило, от 2 до 15 Грей (Гр). Настоящее изобретение особенно эффективно в отношении метастазирующего злокачественного новообразования, когда злокачественное новообразование развилось в распространенное системное заболевание (как определено в настоящем описании выше), в результате абскопального эффекта, возможного благодаря этой технологии, и в отношении гемобластоза и способствует полной и постоянной противоопухолевой активности.

Абскопальный эффект представляет собой явление, наблюдаемое при лечении метастазирующего злокачественного новообразования, когда локализованное облучение конкретного участка опухоли вызывает ответ в участке, отдаленном относительно облученного объема. Лучевая терапия может помочь реверсировать толерантность к слабоиммуногенным опухоле-ассоциированным антигенам для вызывания противоопухолевого иммунного ответа. Однако, абскопальный эффект остается редким клиническим явлением при использовании лучевой терапии в отдельности. Kobe Reynders et al. сообщают о 23 клинических случаях абскопального эффекта после лучевой терапии в период между 1973 и 2013 гг. (Kobe Reynders et al., Cancer Treatment Review 2015).

Благодаря настоящему изобретению, локальное облучение способно вызывать развитие длительно-го противоопухолевого ответа по сравнению с лучевой терапией в отдельности, таким образом, усиливая локальный и системный контроль опухоли.

Примеры, впервые представленные в настоящем описании авторами настоящего изобретения, свидетельствуют о повышении *in vitro* молекулярных структур, ассоциированных с повреждениями (DAMP), индуцируемых умирающими злокачественными клетками [в настоящем описании тестировали линии злокачественных клеток, включающие радиочувствительные линии клеток (такие как линия клеток колоректального рака человека HCT 116) и радиорезистентные линии клеток (такие как линия клеток глиобластомы человека 42 MG BA или линия клеток рака поджелудочной железы человека PANC-1)], при использовании наночастицы и/или агрегата наночастиц в качестве терапевтической вакцины.

Наибольший интерес представляет то, что вакцинация иммунокомпетентных мышей с использованием клеток колоректального рака мыши CT-26, обработанных наночастицами и/или агрегатами наночастиц по настоящему изобретению и облученных *in vitro*, в значительной степени предотвращает образование опухоли, когда животным через 7 дней вводили здоровые/живые злокачественные клетки CT-26, по сравнению с лучевой терапией в отдельности. Такие результаты неожиданно свидетельствуют о том, что комбинация наночастиц по изобретению и лучевой терапии усиливает иммунный ответ и преобразует умирающие злокачественные клетки в эффективную вакцину против злокачественных клеток.

В предпочтительном аспекте представленные в настоящем описании продукты по изобретению (наночастица и/или агрегат наночастиц и композиции, содержащие такую наночастицу и/или агрегат наночастиц), предпочтительно предназначены для применения в отношении индивидуума, выбранного из индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, и индивидуума, страдающего гемобластозом, и предпочтительно предназначены для применения в отношении индивидуума, выбранного из индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, и индивидуума, страдающего гемобластозом.

Индивидуум, страдающий метастазирующим злокачественным новообразованием, как правило, является индивидуумом, как определено в настоящем описании, страдающим злокачественным новообразованием, имеющим множество отдаленных метастазов, как правило, развивающихся в распространенное системное заболевание. Индивидуумов, имеющих множество отдаленных метастазов, в настоящем описании также определяют как "полиметастатических" индивидуумов или пациентов.

Таким образом, в настоящем описании представлена наночастица и/или агрегат наночастиц для применения в качестве терапевтической вакцины или наночастица и/или агрегат наночастиц для применения в получении терапевтической композиции, как правило, вакцинной композиции, для применения (как правило, для применения в лечении злокачественных новообразований) в отношении индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, как правило, метастазирующим злокачественным новообразованием [метастазирующим злокачественным новообразованием, как правило, определяемым в настоящем описании как включающее множество отдаленных метастазов и, как правило, рассматриваемым в качестве распространенного системного заболевания], злокачественным новообразованием, которое не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, или гемобластом, в контексте фракционированной лучевой терапии, включающей по меньшей мере одну стадию облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 20 Грей (Гр), как правило, от 2 до 15 Грей (Гр), и где каждая наночастица состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25, и каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости.

Наночастица и/или агрегат наночастиц, как правило, предназначены для применения в лечении злокачественных новообразований, предпочтительно в выбранной группе индивидуумов/пациентов, как правило, индивидуумов, страдающих метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемых паллиативной лучевой терапии, индивидуумов, страдающих метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуумов, страдающих злокачественным новообразованием, которых не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, или индивидуумов, страдающих гемобластомом.

В настоящем описании также представлена вакцинная композиция для применения, как правило, для применения в лечении злокачественных новообразований, в отношении индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, как правило, метастазирующим злокачественным новообразованием (в частности, метастазирующим злокачественным новообразованием, где злокачественное новообразование развивается в распространенное системное заболевание), или гемобластомом, в контексте лучевой терапии, предпочтительно в контексте фракционированной лучевой терапии.

Типичная композиция представляет собой вакцинную композицию, содержащую наночастицу и/или агрегат наночастиц, для применения в лечении злокачественных новообразований у индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, или индивидуума, страдающего гемобластомом, где лечение включает подвергание индивидуума фракционированной лучевой терапии, включающей по меньшей мере одну стадию облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 20 Грей (Гр), и где каждая наночастица состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25, и каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости.

Вакцинная композиция содержит наночастицу или агрегат наночастиц, как представлено в настоящем описании, предпочтительно вместе с фармацевтически приемлемым носителем или средством. Конкретная вакцинная композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство и, необязательно, терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования.

В настоящем описании также представлено применение наночастицы, или агрегата наночастиц, или терапевтической композиции, как определено в настоящем описании, для лечения злокачественного новообразования у индивидуума предпочтительно в выбранной группе индивидуумов/пациентов, как правило, у индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, или индивидуума, страдающего гемобластомом, а также соответствующие способы лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом индивидуума, включающие стадию введения указанному индивидууму наночастицы, или агрегата наночастиц, или терапевтической композиции, как определено в настоящем описании.

Настоящее изобретение дополнительно относится к набору, как правило, набору вакцины, содер-

жащему (i) наночастицу или агрегат наночастиц, как представлено в настоящем описании, или композицию, содержащую такую наночастицу или агрегат наночастиц, предпочтительно вместе с (ii) по меньшей мере одним иммунотерапевтическим средством и/или терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: HMGB1, высвобождающийся в концентрированном супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастиц HfO₂ (NP) из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии (5 Гр в виде одной фракции), представлен в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем.

Фиг. 2: HMGB1, высвобождающийся в концентрированном супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастиц HfO₂ (NP) из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии (10 Гр в виде одной фракции), представлен в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем.

Фиг. 3: HMGB1, высвобождающийся в концентрированном супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастиц HfO₂ (NP) из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии в виде одной фракции, представлен в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем. А) Линия злокачественных клеток является линией клеток колоректального рака человека НСТ 116, и дозы излучения соответствуют 4 и 6 Гр; В) линия злокачественных клеток является линией клеток глиобластомы человека 42 MG BA, и дозы излучения соответствуют 10 и 15 Гр; С) линия злокачественных клеток является линией клеток рака поджелудочной железы человека PANC-1 и доза излучения соответствует 8 Гр.

Хорошо известна адаптация дозы *in vitro* (в виде одной фракции) к радиочувствительности злокачественных клеток. Радиочувствительную линию злокачественных клеток, такую как линия клеток НСТ 116, можно подвергать воздействию более низкой дозы излучения по сравнению с более радиорезистентными линиями злокачественных клеток, такими как линии клеток 42 MG BA и PANC-1. Повышенное образование DAMP, наблюдаемое *in vitro*, предшествует усиленному иммунному ответу *in vivo*.

Фиг. 4: секреция АТФ злокачественными клетками НСТ 116, обработанными или необработанными суспензией наночастиц HfO₂ (NP) из примера 1 и подвергнутыми или неподвергнутыми лучевой терапии (6 Гр в виде одной фракции), представлена в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем.

Фиг. 5: иллюстрация протокола вакцинационного анализа, осуществляемого с использованием линии клеток колоректального рака мыши СТ-26 на иммунокомпетентных мышах, представляющего собой схему инъекций для трех групп, группы 1 (контрольной группы), группы 2 (облучаемой группы: 6 Гр в виде одной фракции) и группы 3 (NP HfO₂ из примера 1, подвергнутых облучению: 6 Гр в виде одной фракции)

Фиг. 6: протокол вакцинационного анализа, где процентная доля мышей без опухолей в группе 1 (контроль), группе 2 (RTx, 6 Гр) и группе 3 (NP HfO₂ из примера 1+RTx, 6 Гр) представлена как функция дней после вакцинации.

Подробное описание изобретения

Лучевая терапия.

Наночастица и/или агрегат наночастиц, а также любая композиция, содержащая такую наночастицу и/или агрегат наночастиц, представлены в настоящем описании для применения в качестве терапевтической композиции или вакцины (композиции) в отношении индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, в частности метастазирующим злокачественным новообразованием, предпочтительно метастазирующим злокачественным новообразованием, где злокачественное новообразование развивается в распространенное системное заболевание, или гемобластомом, в контексте лучевой терапии, т.е. в отношении индивидуума, которому вводят наночастицы и которого затем подвергают лучевой терапии. Другими словами, чтобы они стали применимыми в качестве терапевтической вакцины, наночастицы необходимо подвергать воздействию ионизирующего излучения, что означает, что их применяют в комбинации с лучевой терапией.

Злокачественное новообразование, развивающееся в распространенное системное заболевание, как правило, включает множество отдаленных метастазов, как правило, более 5, предпочтительно более 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 метастазов, и в большинстве случаев ассоциировано с неблагоприятным прогнозом (см. Ralph R. Weichselbaum Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011). Индивидуум, страдающий таким злокачественным новообразованием, дополнительно может иметь, помимо очагов/участков метастазирования, ассоциированных с указанным злокачественным новообразованием, другие участки/очаги злокачественных клеток, представляющие собой очаги первичного и/или метастазирующего злокачественного новообразования, ассоциированные с другим первичным злокачественным новообразованием/опухолью.

Конкретная композиция, представленная в настоящем описании, является вакцинной композицией, содержащей наночастицу и/или агрегат наночастиц, для применения в лечении злокачественных новообразований у индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и под-

вергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого лучевая терапия была отклонена (как правило отклонена как (общее) радикальное лечение), индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не лечат (общепринятым образом/классически) посредством лучевой терапии, или индивидуума, страдающего гемобластомом, где лечение включает подвергание индивидуума фракционированной лучевой терапии, включающей по меньшей мере одну стадию облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 20 Грей (Гр), и где каждая наночастица состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25, и каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости.

В контексте настоящего изобретения индивидуум или пациент представляет собой млекопитающего. В конкретном варианте осуществления млекопитающее является человеком любого возраста или пола. Индивидуум страдает злокачественным новообразованием.

Предпочтительный индивидуум, который, вероятно, получит пользу от изобретения, как правило, страдает солидным раком или гемобластомом.

В конкретном аспекте индивидуум страдает злокачественным новообразованием, подвергаемым общепринятому лечению посредством лучевой терапии, или где лучевая терапия является общепринятым лечением или наиболее подходящим лечением для конкретного индивидуума, или где лучевую терапию могут проводить по показаниям.

В другом конкретном и предпочтительном аспекте индивидуум, который получит пользу от настоящего изобретения, является индивидуумом, страдающим злокачественным новообразованием, где лучевую терапию не будут рассматривать в качестве варианта лечения (или, другими словами, не рассматривают в качестве общепринятого лечения или возможного радикального лечения для рассматриваемого индивидуума, или ее используют исключительно против одного или малого количества, как правило, менее пяти, участков/очагов злокачественных клеток, являющихся метастатическими или первичными очагами злокачественного новообразования среди множества участков/очагов злокачественных клеток, присутствующих у индивидуума) или больше не рассматривают в качестве варианта (радикального) лечения, как правило, когда индивидуума подвергают паллиативному лечению, или когда лучевая терапия была отклонена. Если проводят паллиативное лечение, индивидуума все равно подвергают лучевой терапии, но указанную лучевую терапию больше нельзя рассматривать в качестве радикальной лучевой терапии.

В этом контексте индивидуум предпочтительно является индивидуумом, страдающим метастазирующим злокачественным новообразованием с множеством отдаленных метастазов (т.е. распространенными метастазами), как правило, более 5, предпочтительно более 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 метастазов, как описано выше.

Другими словами, наночастицы и/или агрегаты наночастиц по настоящему изобретению при воздействии ионизирующего излучения могут представлять собой решение для групп пациентов, в случае которых онколог не рассматривает лучевую терапию в качестве радикального лечения.

Теперь посредством настоящего изобретения таким конкретным индивидуумам предлагают вариант радикального лечения злокачественных опухолей.

Типичный индивидуум, страдающий злокачественным новообразованием, который, вероятно, получит пользу от изобретения, выбран из индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не лечат (общепринятым образом/классически) посредством лучевой терапии, и индивидуума, страдающего гемобластомом. Предпочтительно индивидуум выбран из индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, и индивидуума, страдающего гемобластомом.

В этой области и в контексте настоящего изобретения термин "радикальное лечение" или "радикальная терапия" относится к лечению или терапии, в частности "лучевой терапии", предоставляющей индивидууму, подвергаемому лечению, радикальное решение для лечения злокачественных новообразований, которыми он/она страдает, предназначенное для общего лечения указанного индивидуума (первичные опухоли, а также соответствующие очаги метастазирования).

Как известно специалисту в этой области, паллиативную лучевую терапию используют для облегчения симптомов, и она отличается от лучевой терапии, т.е. лучевой терапии, осуществляемой в качестве радикального лечения (также определенной в настоящем описании как "радикальная лучевая терапия"). Фактически, специалисты рассматривают паллиативную лучевую терапию в качестве эффективного лечения многих симптомов, вызываемых местнораспространенными или метастазирующими опухолями, даже в случае пациентов с небольшой ожидаемой продолжительностью жизни.

Как правило, метастазирующее злокачественное новообразование поражает (i) соединительную

ткань, и оно предпочтительно выбрано из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеосаркомы, хордомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, (ii) эндотелиальной или мезотелиальной ткани, и оно предпочтительно выбрано из гемангиосаркомы, ангиосаркомы, лимфангиосаркомы и мезотелиомы, (iii) мышечной ткани, и оно предпочтительно выбрано из лейомиосаркомы и рабдомиосаркомы, (iv) эпителиальной ткани, и оно предпочтительно выбрано из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы и эпидермоидной карциномы, (v) нервной ткани, и оно предпочтительно выбрано из мультиформной глиобластомы, глиомы, нейробластомы, медуллобластомы, менингиомы, нейрофибросаркомы и шванномы, и (vi) системы APUD, и оно предпочтительно выбрано из рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка и рака кишечника. В другом предпочтительном варианте осуществления метастазирующее злокачественное новообразование является меланомой.

Метастазирующее злокачественное новообразование может являться злокачественным новообразованием, выбранным, например, из рака кожи, злокачественного новообразования центральной нервной системы, рака головы и шеи, рака легких, рака почки, рака молочной железы, злокачественного новообразования желудочно-кишечного тракта (GIST), рака предстательной железы, рака печени, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака анального канала, рака пищевода, злокачественного новообразования мужской мочеполовой системы, злокачественного новообразования женской половой системы, рака надпочечников и рака забрюшинного пространства, сарком костной ткани и мягких тканей, злокачественных новообразований детского возраста, нейробластомы, злокачественного новообразования центральной нервной системы и саркомы Юинга, или может происходить из него.

Как правило, гемобластоз поражает кровь или лимфоидную ткань. Он, как правило, выбран из лейкоза, миеломы и лимфомы.

Индивидуум может иметь опухоль. Если в настоящем описании не указано иначе, опухоль является злокачественной опухолью.

В другом варианте осуществления индивидуум страдает гемобластозом, и лучевая терапия предписана онкологом (например, в случае лимфомы).

Предпочтительно лучевая терапия, которой должны подвергать индивидуума, является фракционированной лучевой терапией, предпочтительно фракционированной лучевой терапией, включающей по меньшей мере одну стадию облучения (также обозначаемой в настоящем описании как "фракционированное лечение"), как правило, несколько стадий облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 20 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 15 Грей (Гр) на стадию облучения.

В контексте фракционированной лучевой терапии общую дозу ионизирующего излучения делят на несколько меньших доз за период в несколько дней. Это позволяет максимизировать эффект облучения в отношении злокачественного новообразования и минимизировать отрицательные побочные эффекты в отношении здоровых клеток. В случае типичных схем фракционирования общую дозу делят на 30 единиц/фракций, вводимых каждый будний день в течение 6 недель, хотя в проводимых в настоящее время исследованиях рассматривают благоприятные эффекты ускоренного фракционирования (2 введения в сутки и/или дополнительные введения в выходные дни).

Термин "ионизирующее излучение" относится к частицам высокой энергии или волнам, которые могут ионизировать атом или молекулу. Способность к ионизации зависит от энергии отдельных частиц или волн, а не от их количества. Большой поток частиц или волн, в большинстве случаев, не будет вызывать ионизацию, если отдельные частицы или волны не обладают достаточной энергией. Типичным ионизирующим излучением является радиация, энергия которого составляет по меньшей мере 1,8 кэВ.

В предпочтительном варианте осуществления доза ионизирующего излучения на стадию облучения выбрана из 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 и 30 Гр на фракционированное лечение. Доза ионизирующего излучения предпочтительно выбрана из 1,8, 2, 2,4, 2,5, 3, 3,2, 3,6, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25 и 30 Гр на фракционированное лечение, даже более предпочтительно от 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25 и 30 Гр.

Предпочтительную фракционированную лучевую терапию можно выбирать из 25 фракций по 2 Гр (всего: 50 Гр), 30 фракций по 2 Гр (всего: 60 Гр), 35 фракций по 2 Гр (всего: 70 Гр), 40 фракций по 2 Гр (всего: 80 Гр), 5 фракций по 3 Гр (всего: 15 Гр), 10 фракций по 3 Гр (всего: 30 Гр), 15 фракций по 3 Гр (всего: 45 Гр), 20 фракций по 3 Гр (всего: 60 Гр), 25 фракций по 3 Гр (всего: 75 Гр), 3 фракций по 4 Гр (всего: 12 Гр), 5 фракций по 4 Гр (всего: 20 Гр), 8 фракций по 4 Гр (всего: 32 Гр), 10 фракций по 4 Гр (всего: 40 Гр), 15 фракций по 4 Гр (всего: 60 Гр), 20 фракций по 4 Гр (всего: 80 Гр), 2 фракций по 5 Гр (всего: 10 Гр), 3 фракций по 5 Гр (всего: 15 Гр), 4 фракций по 5 Гр (всего: 20 Гр), 5 фракций по 5 Гр (всего: 25 Гр), 6 фракций по 5 Гр (всего: 30 Гр), 8 фракций по 5 Гр (всего: 40 Гр), 10 фракций по 5 Гр (всего: 50 Гр), 1 фракции по 6 Гр (всего: 6 Гр), 2 фракций по 6 Гр (всего: 12 Гр), 3 фракций по 6 Гр (всего: 18 Гр), 4 фракций по 6 Гр (всего: 24 Гр), 5 фракций по 6 Гр (всего: 30 Гр), 6 фракций по 6 Гр (всего: 36 Гр), 10 фракций по 6 Гр (всего: 60 Гр), 1 фракции по 7 Гр (всего: 7 Гр), 2 фракций по 7 Гр (всего: 14 Гр), 3 фракций по 7 Гр (всего: 21 Гр), 4 фракций по 7 Гр (всего: 28 Гр), 5 фракций по 7 Гр (всего: 35 Гр), 1 фракции по 8 Гр (всего: 8 Гр), 2 фракций по 8 Гр (всего: 16 Гр), 3 фракций по 8 Гр (всего: 24 Гр), 4

фракций по 8 Гр (всего: 32 Гр), 5 фракций по 8 Гр (всего: 40 Гр), 1 фракции по 9 Гр (всего: 9 Гр), 2 фракций по 9 Гр (всего: 18 Гр), 3 фракций по 9 Гр (всего: 27 Гр), 4 фракций по 9 Гр (всего: 36 Гр), 5 фракций по 9 Гр (всего: 45 Гр), 1 фракции по 10 Гр (всего: 10 Гр), 2 фракций по 10 Гр (всего: 20 Гр), 3 фракций по 10 Гр (всего: 30 Гр), 4 фракций по 10 Гр (всего: 40 Гр), 1 фракции по 15 Гр (всего: 15 Гр), 2 фракций по 15 Гр (всего: 30 Гр), 3 фракций по 15 Гр (всего: 45 Гр), 4 фракций по 15 Гр (всего: 60 Гр), 1 фракции по 20 Гр (всего: 20 Гр), 2 фракций по 20 Гр (всего: 40 Гр), 3 фракций по 20 Гр (всего: 60 Гр), 1 фракции по 25 Гр (всего: 25 Гр), 2 фракций по 25 Гр (всего: 50 Гр), 3 фракций по 25 Гр (всего: 75 Гр), 1 фракции по 30 Гр (всего: 30 Гр), и 2 фракций по 30 Гр (всего: 60 Гр).

В особенно предпочтительном аспекте индивидуум является индивидуумом, страдающим метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемым паллиативной лучевой терапии, индивидуумом, страдающим метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого лучевая терапия была отклонена, или индивидуумом, страдающим злокачественным новообразованием, которого не подвергают лечению посредством лучевой терапии, и фракционированная лучевая терапия выбрана из 1 фракции по 6 Гр (всего: 6 Гр), 2 фракций по 6 Гр (всего: 12 Гр), 3 фракций по 6 Гр (всего: 18 Гр), 4 фракций по 6 Гр (всего: 24 Гр), 5 фракций по 6 Гр (всего: 30 Гр), 1 фракции по 7 Гр (всего: 7 Гр), 2 фракций по 7 Гр (всего: 14 Гр), 3 фракций по 7 Гр (всего: 21 Гр), 4 фракций по 7 Гр (всего: 28 Гр), 1 фракции по 8 Гр (всего: 8 Гр), 2 фракций по 8 Гр (всего: 16 Гр), 3 фракций по 8 Гр (всего: 24 Гр), 4 фракций по 8 Гр (всего: 32 Гр), 1 фракции по 9 Гр (всего: 9 Гр), 2 фракций по 9 Гр (всего: 18 Гр), 3 фракций по 9 Гр (всего: 27 Гр), 1 фракции по 10 Гр (всего: 10 Гр), 2 фракций по 10 Гр (всего: 20 Гр), 3 фракций по 10 Гр (всего: 30 Гр), 1 фракции по 15 Гр (всего: 15 Гр), 2 фракций по 15 Гр (всего: 30 Гр), 1 фракции по 20 Гр (всего: 20 Гр), 2 фракций по 20 Гр (всего: 40 Гр), 1 фракции по 25 Гр (всего: 25 Гр) и 1 фракции по 30 Гр (всего: 30 Гр).

Наночастица.

Наночастица, используемая в контексте изобретения, предпочтительно состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25. Наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости.

В настоящем описании термин "наночастица" относится к продукту, в частности синтетическому продукту, с размером в нанометровом диапазоне, как правило, от 1 до 500 нм.

Термин "агрегат наночастиц" относится к совокупности наночастиц, сильно, как правило, ковалентно, связанных друг с другом.

Для измерения размера наночастиц можно использовать просвечивающую электронную микроскопию (ТЕМ). Кроме того, для измерения гидродинамического диаметра наночастиц в растворе можно использовать динамическое светорассеяние (DLS). Два этих способа можно дополнительно использовать друг за другом для сравнения измеренных размеров и подтверждения указанного размера. Предпочтительным способом является DLS (см. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008). Наибольший размер наночастицы, как определено в настоящем описании, как правило, составляет от приблизительно 4 до приблизительно 250 нм, предпочтительно от приблизительно 4 или 10 до приблизительно 100 нм или приблизительно 200 нм, даже более предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 150 нм.

Так как форма частицы может влиять на ее "биосовместимость", предпочтительной является частица, имеющая достаточно однородную форму. Таким образом, по фармакокинетическим причинам предпочтительными являются наночастицы, являющиеся, по существу, сферическими, круглыми или яйцевидными по своей форме. Такая форма также благоприятствует взаимодействию или захвату наночастиц клетками. Сферическая или круглая форма является особенно предпочтительной.

Как правило, наибольший размер является диаметром наночастицы круглой или сферической формы или наибольшим размером наночастицы яйцевидной или овальной формы.

Неорганический материал наночастицы, присутствующей в композиции, предпочтительно имеет теоретическую (объемную) плотность по меньшей мере 7, и его можно выбирать из любого материала, проявляющего это свойство и представленного в таблице из Physical Constants of Inorganic Compounds, приведенной на стр. 4-43 в Handbook of Chemistry and Physics (David R. Lide Editor-in-Chief, 88th Edition 2007-2008).

Неорганический материал, составляющий наночастицу, предпочтительно является материалом, имеющим эффективное атомное число (Z_{eff}) по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 40 или 41, более предпочтительно по меньшей мере 50 или 51, более предпочтительно по меньшей мере 60, 61, 62 или даже 63.

Термин "эффективное атомное число" схож с термином "атомным числом", но его используют для соединений (например, воды) и смесей различных материалов (таких как ткань и кость), а не атомов. С помощью эффективного атомного числа вычисляют среднее атомное число для соединения или смеси материалов. Его сокращенно обозначают как Z_{eff} .

Эффективное атомное число умножают на массовую долю каждого атома в соединении на атомное число атома. Формула эффективного атомного числа Z_{eff} представляет собой:

$$Z_{eff} = \sqrt[2.94]{f_1 \times (Z_1)^{2.94} + f_2 \times (Z_2)^{2.94} + f_3 \times (Z_3)^{2.94} + \dots}$$

где

f_n представляет собой долю от общего количества электронов, связанных с каждым элементом, и Z_n является атомным числом каждого элемента.

Атомное число (также известное как протонное число) представляет собой количество протонов, обнаруживаемых в ядре атома. Его общепринято обозначают символом Z . Атомное число уникальным образом определяет химический элемент. В атоме с нейтральным зарядом атомное число равно количеству электронов.

Примером является вода (H_2O), состоящая из двух атомов водорода ($Z=1$) и одного атома кислорода ($Z=8$). Общее количество электронов составляет $1+1+8=10$. Доля электронов, соответствующих двум атомам водорода, составляет $2/10$, и доля электронов, соответствующих единственному атому кислорода, составляет $(8/10)$. Таким образом, Z_{eff} воды представляет собой:

$$Z_{eff} = \sqrt[2.94]{0.2 \times 1^{2.94} + 0.8 \times 8^{2.94}} = 7.42$$

Z_{eff} вносит свой вклад в способность наночастиц поглощать падающее излучение.

Неорганический материал, составляющий наночастицу, как правило, выбран из оксида, металла, сульфида и любой их смеси.

Если неорганический материал, составляющий наночастицу, является оксидом, этот оксид предпочтительно выбран из оксида церия (IV) (CeO_2), оксида неодима (III) (Nd_2O_3), оксида самария (III) (Sm_2O_3), оксида европия (III) (Eu_2O_3), оксида гадолиния (III) (Gd_2O_3), оксида тербия (III) (Tb_2O_3), оксида диспрозия (III) (Dy_2O_3), оксида гольмия (Ho_2O_3), оксида эрбия (Er_2O_3), оксида тулия (III) (Tm_2O_3), оксида иттербия (Yb_2O_3), оксида лютеция (Lu_2O_3), оксида гафния (IV) (HfO_2), оксида тантала (V) (Ta_2O_5), оксида рения (IV) (ReO_2), оксида висмута (III) (Bi_2O_3). В контексте настоящего изобретения для получения наночастицы по изобретению также можно использовать смесь неорганических оксидов.

Если неорганический материал, составляющий наночастицу, является металлом, этот металл предпочтительно выбран из золота (Au), серебра (Ag), платины (Pt), палладия (Pd), олова (Sn), тантала (Ta), иттербия (Yb), циркония (Zr), гафния (Hf), тербия (Tb), тулия (Tm), церия (Ce), диспрозия (Dy), эрбия (Er), европия (Eu), гольмия (Ho), железа (Fe), лантана (La), неодима (Nd), празеодима (Pr), лютеция (Lu). В контексте настоящего изобретения также возможна смесь металлов. В контексте настоящего изобретения для получения наночастицы по изобретению также можно использовать смесь неорганического оксида и металла.

Если неорганический материал, составляющий наночастицу, является сульфидом, этот сульфид предпочтительно является сульфидом серебра (Ag_2S).

В предпочтительном варианте осуществления наночастицу, используемую в контексте настоящего изобретения для получения интересующей композиции, можно покрывать биосовместимым материалом, выбранным из средства, проявляющего свойство малой заметности. Фактически, если наночастицы по настоящему изобретению вводят индивидууму внутривенным (IV) путем, биосовместимое покрытие материалом, выбранным из средства, проявляющего свойство малой заметности, является особенно предпочтительным для оптимизации биологического распределения наночастиц. Указанное покрытие отвечает за так называемое "свойство малой заметности" наночастицы.

Средство, проявляющее свойства малой заметности, может являться средством, экспонирующим стерическую группу. Такую группу можно выбирать, например, из полиэтиленгликоля (PEG); полиэтиленоксида; поливинилового спирта; полиакрилата; полиакриламида (поли(N-изопропилакриламида)); поликарбамида; биополимера; полисахарида, такого как декстран, ксилан и целлюлоза; коллагена; цвиттер-ионного соединения, такого как полисульфобеттаин; и т.д.

В другом предпочтительном варианте осуществления наночастицы можно покрывать биосовместимым материалом, выбранным из средства, делающего возможным взаимодействие с биологической мишенью. Такое средство, как правило, может придавать положительный или отрицательный заряд поверхности наночастицы. Этот заряд можно определять посредством измерений дзета-потенциала, как правило, осуществляемых на суспензиях наночастиц, концентрация которых варьируется от 0,2 до 10 г/л, суспендированных в водной среде с pH от 6 до 8.

Средство, формирующее положительный заряд на поверхности наночастицы, может являться, например, аминопропилтриэтоксисиланом или полилизинном. Средство, формирующее отрицательный заряд на поверхности наночастицы, может являться, например, фосфатом (например, полифосфатом, метафосфатом, пирофосфатом и т.д.), карбоксилатом (например, цитратом или дикарбоновой кислотой, в частности янтарной кислотой) или сульфатом.

Полное биосовместимое покрытие наночастицы или агрегата может являться предпочтительным, в частности, при внутривенном (IV) введении, во избежание взаимодействия поверхности частицы с любым распознающим элементом (макрофагом, опсонинами и т.д.). Термин "полное покрытие" подразумевает наличие очень высокой компактности биосовместимых молекул, способных создавать, по меньшей мере, полный монослой на поверхности частицы.

Биосовместимое покрытие делает возможной, в частности, стабильность наночастицы в жидкости, такой как физиологическая жидкость (кровь, плазма, сыворотка и т.д.), или любые изотонические среды, или физиологическая среда, необходимая для фармацевтического введения.

Стабильность можно подтверждать посредством вычисления сухого остатка с использованием сушильной печи и измерять в суспензии наночастиц до и после фильтрации, как правило, на фильтре 0,22 или 0,45 мкм.

Предпочтительно покрытие сохраняет целостность частицы *in vivo*, обеспечивает или улучшает ее биосовместимость и облегчает ее необязательную функционализацию (например, с использованием спейсерных молекул, биосовместимых полимеров, средств для направленного воздействия, белков и т.д.).

Конкретная наночастица по настоящему изобретению дополнительно может содержать средство для направленного воздействия, делающее возможным ее взаимодействие с распознающим элементом, присутствующим на клетке-мишени. Такое средство для направленного воздействия, как правило, действует после накопления наночастиц в участке-мишени. Средство для направленного воздействия может являться любой биологической или химической структурой, демонстрирующей аффинность к молекулам, присутствующим в организме человека или животного. Например, оно может являться пептидом, олигопептидом или полипептидом, белком, нуклеиновой кислотой (ДНК, РНК, мРНК, тРНК, мкРНК и т.д.), гормоном, витамином, ферментом, лигандом молекулы, экспрессируемой патологической клеткой, в частности лигандом опухолевого антигена, рецептором гормона, цитокиновым рецептором или рецептором фактора роста. Указанные средства для направленного воздействия можно выбирать, например, из группы, состоящей из LHRH, EGF, фолата, антитела против V-FN, E-селектина/P-селектина, антитела против ИЛ-2R, GHRH и т.д.

Композиция.

В настоящем описании авторы настоящего изобретения также описывают терапевтическую композицию, как правило, вакцинную композицию, для применения в отношении индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, как определено в настоящем описании, предпочтительно метастазирующим злокачественным новообразованием или гемобластозом, в контексте лучевой терапии, как правило, фракционированной лучевой терапии, как определено в настоящем описании, где композиция содержит (i) наночастицу или агрегат наночастиц, при этом каждая наночастица состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25, и каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим наночастице быть стабильной при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости предпочтительно вместе с (ii) фармацевтически приемлемым носителем или средством.

В конкретном варианте осуществления описывают вакцинную композицию, содержащую наночастицу и/или агрегат наночастиц, для применения в лечении злокачественных новообразований у индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, индивидуума, страдающего метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого (радикальная) лучевая терапия была отклонена, индивидуума, страдающего злокачественным новообразованием, которого не подвергают лечению посредством лучевой терапии, или индивидуума, страдающего гемобластозом, где лечение включает подвергание индивидуума фракционированной лучевой терапии, включающей по меньшей мере одну стадию облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), предпочтительно от 1,8 до 20 Грей (Гр), и где каждая наночастица состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25, и каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости. Помимо наночастицы и/или агрегата наночастиц, композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель или средство.

Фармацевтически приемлемый носитель или средство могут являться любой основой, общепринятой для специалистов в этой области, такой как, например, физиологический раствор, изотонический, стерильный, забуференный раствор, неводный раствор носителя и т.п. Типичным носителем являются изотонические среды или физиологические среды, содержащие NaCl, PBS и/или глюкозу. Носитель может содержать, например, глюкозу (5%), или декстрозу (5%), и/или NaCl (0,9%).

Композиция также может содержать стабилизаторы, подсластители, поверхностно-активные вещества, полимеры и т.п.

Композиция может находиться в форме твердого вещества, жидкости (частицы в суспензии), аэрозоль, геля, пасты и т.п. Предпочтительные композиции находятся в форме жидкости или геля. Особенно предпочтительные композиции находятся в форме жидкости.

Их можно составлять, например, в виде ампулы, шприца, аэрозоля, бутылки, сосуда, таблетки, капсулы способами получения фармацевтических составов, известными специалисту в этой области.

Как правило, композиция в форме жидкости или геля содержит от приблизительно 0,05 г/л до приблизительно 450 г/л наночастиц или агрегатов наночастиц, от приблизительно 0,05 г/л до приблизительно 250 г/л наночастиц, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или 400 г/л наночастиц.

Концентрацию наночастиц в композиции можно измерять по сухому остатку. Сухой остаток теоретически измеряют после стадии сушки суспензии, содержащей наночастицы, в сушильной печи.

В конкретном варианте осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство и, необязательно, дополнительное терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования.

В настоящем описании термин "иммунотерапевтическое средство", как правило, означает любую молекулу, лекарственное средство, клетку или вакцину на основе клеток, онколитический вирус, вакцину на основе ДНК, вакцину на основе пептидов, агониста толл-подобных рецепторов, везикулу, полученную из клетки, а также любую их комбинацию, способную стимулировать иммунную систему индивидуума и известную специалисту в этой области.

Молекулу или лекарственное средство, например, можно выбирать из моноклонального антитела, цитокина и их комбинации.

Лекарственное средство, как правило, может являться ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), таким как 1-метил-D-триптофан.

В предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело ингибирует молекулу CTLA-4 или взаимодействие между PD-1 и его лигандами. Моноклональное антитело предпочтительно выбрано из антитела против CTLA-4, против PD-1, против PD-L1, против PD-L2. Моноклональное антитело, например, можно выбирать из ипилимумаба, тремелиумаба, ниволумаба, пембролизумаба, пидлизумаба и ламбролизумаба.

В другом предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело усиливает передачу сигнала CD27, передачу сигнала CD137, передачу сигнала OX-40, передачу сигнала GITR и/или передачу сигнала МНСII и/или активирует CD40. Моноклональное антитело, например, можно выбирать из дасетузамаба, лукатумумаба, и урелумаба.

В дополнительном варианте осуществления моноклональное антитело ингибирует передачу сигнала TGF- β или передачу сигнала KIR. Моноклональное антитело, например, можно выбирать из фресолумаба и лиримаумаба.

Цитокин предпочтительно можно выбирать из гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), лиганда FMS-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L), ИФН α , ИФН α 2b, ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10 и ИЛ-15.

В другом предпочтительном варианте осуществления иммунотерапевтическое средство является иммуноцитокин, например иммуноцитокин L19-IL2 (Nicolle H. Rekers Radiotherapy and Oncology 2015).

Клетка, используемая в качестве иммунотерапевтического средства, как правило, является иммунной клеткой, презентующей опухолевый антиген или сенсibilизированной опухолевым антигеном, предпочтительно опухолевым антигеном, специфичным для злокачественного новообразования, подлежащего лечению, такой как дендритная клетка или Т-клетка; клеткой, секретирующей иммуногенную молекулу; или мертвой опухолевой клеткой или умирающей опухолевой клеткой, подвергавшейся иммуногенной гибели клеток, т.е. клеткой, экспрессирующей CRT, и/или продуцирующей HMGB1, и/или продуцирующей АТФ в типичном для ICD количестве, например умирающей или мертвой опухолевой клеткой, подвергавшейся воздействию при лучевой терапии. Клетка может являться аутологичной клеткой или аллогенной клеткой. Предпочтительно клетка является аутологичной клеткой, выделенной из индивидуума, подлежащего лечению. Мертвая или умирающая опухолевая клетка может являться зрелой опухолевой клеткой или опухолевой стволовой клеткой.

Агонист толл-подобного рецептора предпочтительно выбран из агониста TLR 2/4, агониста TLR 7, агониста TLR 7/8 и агониста TLR 9. Агонист толл-подобного рецептора, например, можно выбирать из имиквимода, бациллы Кальметта-Герена и монофосфорил-липида А.

Предпочтительную комбинацию иммунотерапевтических средств, например, можно выбирать из цитокина, моноклонального антитела, агониста толл-подобного рецептора и вакцины на основе пептида.

В настоящем описании термин "терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования", как правило, означает средство, используемое в общепринятом лечении злокачественного новообразования, такое как биологическое соединение, низкомолекулярное направленное терапевтическое средство или цитотоксическое соединение.

Биологическое соединение, например, является антителом, предпочтительно моноклональным антителом ("mAb"), таким как алемтузумаб, брентуксимаб ведотин, катумаксомаб, деносуамаб, гемтузумаб озогамидин, ибридумомаб тиуксетан, пертузумаб, офатумумаб, бевацизумаб, ритуксимаб, трастузумаб, цетуксимаб, панатимумаб или тозитумомаб.

Низкомолекулярное направленное терапевтическое средство, как правило, ингибирует ферментативные домены на мутантном, гиперэкспрессированном или ином критическом белке (потенциальной

мишени в отношении лечения злокачественных опухолей) в злокачественных клетках. Некоторые терапевтические средства включают средства, направленно воздействующие на деление клеток (например, ингибитор киназ Аурога или ингибитор циклин-зависимых киназ), а также другие биологические механизмы, такие как белковый обмен и модификация хроматина (например, ингибитор гистондеацетилазы). Низкомолекулярные направленные терапевтические средства, например, можно выбирать из иматиниба, рапамицина, гефитиниба, эрлотиниба, сорафениба, сунитиниба, нилотиниба, дасатиниба, лапатиниба, бортезомиба и аторвастатина и т.д.

Цитотоксическое соединение, например, является ДНК-модифицирующим средством, таким как антрациклин (такой как дексаметазон, даунорубин, идарубин или метотрексат) или антимитотическое средство (веретенный яд, такой как винкристин или винбластин); таксаном, таким как доцетаксел, ларотаксел, кабацитаксел, паклитаксел (PG-паклитаксел и ДНА-паклитаксел), ортатаксел, тесетаксел или таксопрексин; гемцитабин; эпопозид; митомицин С; алкилирующим средством (например, мелфаланом или темозоломидом); средством на основе платины, таким как оксалиплатин или карбоплатин; лигандом TLR (толл-подобного рецептора)-3 и пролекарством.

Пролекарство (например, капецитабин или иринотекан) метаболизируется в его активной форме *in vivo*, вызывая ожидаемый терапевтический эффект.

Другие типичные цитотоксические соединения, как правило, выбраны из химиотерапевтических средств, как представлено в настоящем описании или известно специалисту в области онкологии.

Представленную в настоящем описании вакцинную композицию, содержащую по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство, возможно, в комбинации по меньшей мере с одним терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, можно вводить индивидууму, подвергнутому лечению, одновременно или отдельно от наночастиц или агрегатов наночастиц, как представлено в настоящем описании.

Набор.

В настоящем описании авторы настоящего изобретения также описывают набор вакцины, содержащей (i) наночастицу или агрегат наночастиц, состоящих из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см^3 и атомное число (Z) по меньшей мере 25, при этом каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим наночастице быть стабильной при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости, или вакцинную композицию, как представлено в настоящем описании предпочтительно вместе с (ii) по меньшей мере одним иммунотерапевтическим средством и/или терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, как представлено в настоящем описании, и, необязательно, (iii) брошюрой с инструкциями по осуществлению вакцинации в контексте лучевой терапии.

Протокол.

Наночастицы или агрегаты наночастиц, как представлено в настоящем описании, или композицию, содержащую такие наночастицы или агрегаты наночастиц, предпочтительно приводят в контакт со злокачественными клетками до проведения лучевой терапии, как правило, фракционированной лучевой терапии. Контакт между наночастицами и злокачественными клетками можно осуществлять *ex vivo* после биопсии или забора крови или *in vivo* посредством их введения индивидууму, подвергнутому лечению, системно или напрямую в опухоль, ложе опухоли (после резекции опухоли посредством хирургического вмешательства) или метастазы опухоли.

При введении *in vivo* наночастицы по изобретению можно вводить индивидууму с использованием различных возможных путей, таких как местный [внутриопухолевый (IT), внутриартериальный (IA)], подкожный, внутривенный (IV), внутрикожный путь, введение через дыхательные пути (ингаляция), интраперитонеальный, внутримышечный, внутрисуставной, интратекальный, внутриглазной или пероральный путь (*per os*) предпочтительно с использованием IT, IV или IA.

При необходимости можно осуществлять повторные инъекции или введения наночастиц.

В конкретном варианте осуществления наночастицу или агрегат наночастиц предпочтительно вводят индивидууму, подлежащему лечению, вместе по меньшей мере с одним иммунотерапевтическим средством. Наночастицу, или агрегат наночастиц, или композицию, содержащую такую наночастицу или агрегат наночастиц и по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство, можно вводить индивидууму одновременно или раздельно.

В конкретном варианте осуществления, если злокачественное новообразование является метастазирующим злокачественным новообразованием и/или злокачественным новообразованием, которое не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, по меньшей мере одну стадию облучения, как правило, осуществляют *in vivo* в отношении одного, но не более двух, участков опухоли метастазирующего злокачественного новообразования, содержащих наночастицы или агрегаты наночастиц. Благодаря наночастицам или агрегатам наночастиц, используемым в качестве вакцины, можно наблюдать противоопухолевый эффект лучевой терапии вне облученной области или участка по причине эффективной мобилизации иммунной системы индивидуума.

В целом, в настоящем описании авторы настоящего изобретения демонстрируют, что значительное повышение HMGB1, высвобождаемого умирающими злокачественными клетками, наблюдают при ис-

пользовании наночастиц или агрегатов наночастиц по изобретению, подвергаемых воздействию ионизирующего излучения, по сравнению с облучением в отдельности в радиочувствительных НСТ 116 (линии клеток колоректального рака человека) и радиорезистентных 42 MG BA (линии клеток глиобластомы человека) и PANC-1 (линии клеток рака поджелудочной железы человека) при использовании одной дозы излучения. Кроме того, значительное повышение секреции АТФ умирающими злокачественными клетками наблюдают при использовании наночастиц или агрегатов наночастиц по изобретению, подвергаемых воздействию ионизирующего излучения, по сравнению с облучением в отдельности в линии злокачественных клеток НСТ 116.

Эти DAMP являются признаком иммуногенной гибели злокачественных клеток, и наночастицы или агрегаты наночастиц по настоящему изобретению при подвергании воздействию лучевой терапии могут повышать их секрецию и высвобождение.

Кроме того, результаты вакцинационного анализа, осуществленного на иммунокомпетентных мышах, свидетельствуют о способности наночастиц или агрегатов наночастиц по изобретению эффективно мобилизовать иммунную систему животных, предотвращая появление опухолей, если животных сначала вакцинировали облученными злокачественными клетками, а затем через 7 дней вводили жизнеспособные злокачественные клетки: 66% животных не имели опухолей в группе, вакцинированной с использованием злокачественных клеток, обработанных наночастицами и 6 Гр, в то время как лишь 33% животных не имели опухолей при вакцинации с использованием злокачественных клеток, лишь облученных в дозе 6 Гр.

Эти данные в значительной степени подтверждают применимость этих наночастиц или агрегатов наночастиц в качестве вакцины для достижения противоопухолевого эффекта лучевой терапии вне облученной области или участка по причине эффективной мобилизации иммунной системы индивидуума.

В предпочтительном варианте осуществления наночастица, или агрегат наночастиц по изобретению, или композиция по изобретению, содержащая такую наночастицу или агрегат наночастиц, делают возможным изменение или деструкцию метастатических злокачественных клеток, присутствующих в легких (например, если первичным злокачественным новообразованием является саркома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак почки или рак предстательной железы), печени (например, если первичным злокачественным новообразованием является злокачественное новообразование желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак легких или рак кожи), кости (например, если первичным злокачественным новообразованием является рак молочной железы, рак предстательной железы или рак легких) и/или головной мозг (например, если первичным злокачественным новообразованием является рак легких, рак почки, меланома или рак молочной железы).

В другом конкретном варианте осуществления по меньшей мере одну стадию облучения осуществляют *ex vivo* на образце злокачественного новообразования индивидуума, содержащем наночастицы или агрегаты наночастиц, и летально облученные *ex vivo* злокачественные клетки вместе, по меньшей мере, с частью супернатанта клеток из образца злокачественного новообразования, по меньшей мере, частично вводят индивидууму повторно перед каким-либо необязательным последующим *in vivo* лечением злокачественного новообразования у указанного индивидуума.

Супернатант клеток из облученного образца злокачественного новообразования, как правило, содержит иммуногенные молекулы, такие как HMGB1, АТФ, различные шапероны из семейства белков теплового шока (HSP), а именно белок теплового шока 70 кДа (HSP70) и белок теплового шока 90 кДа (HSP90), иммуностимуляторные цитокины, подобные интерферону α (ИФН α), метаболиты сфингомиелина, продукта распада внеклеточного матрикса и т.д. В контексте настоящего изобретения повышенное высвобождение иммуногенных молекул в супернатанте клеток из облученного образца злокачественного новообразования, содержащего наночастицы или агрегат наночастиц, по сравнению с облученным образцом злокачественного новообразования без наночастиц или агрегата наночастиц (см. пример 4), способно дополнительно усиливать лечение злокачественных опухолей.

Повторное введение индивидууму, подвергаемому лечению, как правило, осуществляют посредством подкожной или внутрикожной инъекции.

Если злокачественное новообразование является гемобластомом, по меньшей мере одну стадию облучения, как правило, осуществляют *ex vivo* на образце гемобластома индивидуума, содержащего наночастицы или агрегаты наночастиц, и облученный образец гемобластома, по меньшей мере, частично вводят индивидууму повторно перед каким-либо необязательным последующим *in vivo* лечением злокачественного новообразования у указанного индивидуума.

Повторное введение индивидууму, подвергаемому лечению можно осуществлять посредством подкожной или внутрикожной инъекции. Его также можно осуществлять посредством внутриартериальной (IA), внутривенной (IV) или интраперитонеальной (IP) инъекции.

Образец гемобластома, как правило, является образцом крови или объемом цельной крови индивидуума, подвергаемого лечению. Если объем цельной крови индивидуума подлежит облучению, его можно осуществлять *ex vivo* при экстракорпоральной перфузии, при этом облученный объем цельной крови полностью вводят индивидууму повторно.

Примечательно, что Y. Suzuki et al. (2012) сообщали о том, что специфические в отношении опухолевого антигена Т-клеточные ответы наблюдали у 38% пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода (ESCC) после химиорадиотерапии, и что этим ответам сопутствовала повышенная концентрация HMGB1 в сыворотке этих пациентов. HMGB1 в микроокружении опухоли в значительной степени положительно регулировался у пациентов с ESCC с предоперационной химиорадиотерапией, но не у пациентов без химиорадиотерапии, и количество HMGB1 положительно коррелировало с выживаемостью пациентов.

В предпочтительном варианте осуществления летально облученные *ex vivo* злокачественные клетки или облученный образец гемобластоза, по меньшей мере, частично вводят индивидууму повторно вместе по меньшей мере с одним дополнительным иммунотерапевтическим средством и/или терапевтическим средством для лечения злокачественного новообразования, как представлено в настоящем описании.

Летально облученные *ex vivo* злокачественные клетки или облученный образец гемобластоза и по меньшей мере одно дополнительное иммунотерапевтическое средство и/или, по меньшей мере, терапевтическое средство для лечения злокачественного новообразования можно вводить индивидууму одновременно или раздельно.

Другие аспекты и преимущества изобретения будут очевидны из следующих примеров, приведенных в иллюстративных целях, но не для ограничения.

Экспериментальный раздел

Пример 1. Синтез и характеристика функционализированных наночастиц оксида гафния (HfO₂).

Раствор гидроксида тетраметиламмония (ТМАОН) добавляют к 40 г раствора HfCl₄. Добавление раствора ТМАОН осуществляют до достижения pH конечной суспензии от 7 до 13. Получают белый осадок.

Затем осадок переносят в автоклав и нагревают при температуре от 120 и 300°C для осуществления кристаллизации. После охлаждения суспензию промывают деионизированной водой.

Стадию пептизации осуществляют для получения стабильной суспензии наночастиц или агрегатов наночастиц.

Затем суспензию гексаметафосфата натрия добавляют к пептизированному раствору (количество гексаметафосфата натрия ниже LD50/5) и pH суспензии доводят до pH от 6,5 до 7,5.

В случае экспериментов *in vitro* стадию стерилизации осуществляют на этой стадии, например, с использованием фильтра 0,22 мкм.

В случае экспериментов *in vivo* стадию составления с использованием 5% глюкозы можно осуществлять до или после стадии стерилизации.

В следующей таблице представлены основные характеристики суспензии биосовместимых наночастиц или агрегатов наночастиц, полученных таким образом.

Плотность	Морфология	Удельная площадь поверхности (SS) в м ² /г	Средний гидродинамический диаметр (Ф) в нм
8,3	Сферические по своей форме	20<SS<60	15<Ф< 200

Пример 2. Синтез наночастиц золота и физико-химическая характеристика наночастиц золота разного размера.

Наночастицы золота получают посредством восстановления хлорида золота цитратом натрия в водном растворе. Способ адаптирован из G. Frens Nature Physical Science 241 (1973) 21.

В типичном эксперименте раствор HAuCl₄ нагревают до кипения. Затем добавляют раствор цитрата натрия. Полученный раствор держат кипящим еще в течение 5 мин.

Размер наночастиц корректируют с 15 до 105 нм, осторожно модифицируя соотношение цитрата и предшественника соединения золота (см. табл. 1).

Затем суспензии полученных таким образом наночастиц золота концентрируют с использованием устройства для ультрафильтрации (кювета с перемешиванием Amicon модели 8400 от Millipore) с использованием целлюлозной мембраны с отсечением по 30 кДа.

В конечном итоге, полученные суспензии фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм (мембрана PES от Millipore) в вытяжном шкафу и хранят при 4°C.

Размер частиц определяют с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) посредством подсчета более 200 частиц, принимая наибольший размер наночастицы в качестве ее размера.

Таблица 1

Образцы	Размер частиц (нм)	Синтез	
		Цитрат	HAuCl ₄
Золото-15	15±2 (1σ)	20 мл 30 мМ	500 мл 0,25 мМ
Золото-30	32±10 (1σ)	7,5 мл 40 мМ	500 мл 0,25 мМ
Золото-60	60±10 (1σ)	2 мл 85 мМ	500 мл 0,25 мМ
Золото-80	80±10 (1σ)	1,2 мл 43 мМ	200 мл 0,30 мМ
Золото-105	105±25 (1σ)	1,2 мл 39 мМ	200 мл 0,33 мМ

Пример 3. Суспензия наночастиц, содержащих материал золота, по меньшей мере, частично покрытый материалом оксида гафния.

Раствор гидроксида тетраметиламмония (ТМАОН) добавляют к раствору хлорида гафния (HfCl₄). Добавление раствора ТМАОН осуществляют до достижения pH конечной суспензии от 7 до 13. Получают белый осадок.

Суспензию частиц золота из примера 2 медленно добавляют к белому осадку при интенсивном перемешивании.

Затем полученный осадок переносят в автоклав и нагревают при температуре от 100 до 300°C. После охлаждения суспензию промывают водой.

Стадию пептизации осуществляют для получения стабильной суспензии наночастиц, содержащих материал золота, по меньшей мере, частично, заключенный в материал оксида гафния.

Затем к пептизированному раствору добавляют суспензию гексаметафосфата натрия и доводят pH суспензии до pH от 6 до 8.

Пример 4. Высвобождение HMGB1 умирающими злокачественными клетками.

Высвобождение HMGB1 умирающими злокачественными клетками исследовали с использованием линии клеток глиобластомы человека 42 MG BA. Линию клеток 42-MG-BA приобретали в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, German Collection of Microorganism and Cell Cultures (Braunschweig, Germany).

Клетки распределяли по флаконам T25 в количестве в диапазоне от $1,5 \times 10^6$ до 2×10^6 клеток/флакон. Когда клетки прикреплялись к поверхности, суспензию наночастиц HfO₂ из примера 1 в концентрации 400 мкМ добавляли на ночь (12-15 ч.) к клеткам перед использованием дозы излучения. Клетки культивировали с антибиотиками (Penistrepto).

Одну дозу рентгеновского излучения 5 или 10 Гр применяли при мощности дозы 1,26 Гр·мин⁻¹ с использованием источника рентгеновского излучения (200 кВ, 15 мА, медный фильтр 0,2 мм).

Клетки культивировали в течение 96 ч при 37°C и 5% CO₂ во влажной камере. Через 96 ч супернатант клеток собирали и концентрировали с использованием фильтров Centricon.

HMGB1 количественно анализировали в концентрированных супернатантах клеток с использованием набора для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) HMGB1 человека.

На фиг. 1 представлен HMGB1, высвобождающийся умирающими злокачественными клетками. HMGB1, высвобождающийся в концентрированном супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастиц HfO₂ из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии (5 Гр в виде 1 фракции), представлен в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем (т.е. линией клеток 42 MG BA без облучения).

На фиг. 2 представлен HMGB1, высвобождающийся умирающими злокачественными клетками. HMGB1, высвобождающийся в концентрированном супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастицы HfO₂ из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии (10 Гр в виде 1 фракции), представлен в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем (т.е. линией клеток 42 MG BA без облучения).

Выводы.

Значительное повышение HMGB1, высвобождающегося умирающими злокачественными клетками, наблюдают в концентрированном супернатанте клеток, обработанных наночастицами оксида гафния из примера 1, при воздействии одной дозы излучения 5 или 10 Гр по сравнению с облучением в отдельности. Эти результаты подтверждают концепцию применения этих наночастиц или агрегатов наночастиц в качестве терапевтической вакцины в контексте лучевой терапии.

Пример 5. Высвобождение HMGB1 умирающими злокачественными клетками в различных линиях клеток.

Высвобождение HMGB1 умирающими злокачественными клетками исследовали с использованием линии клеток колоректального рака человека HCT 116, линии клеток глиобластомы человека 42 MG BA и линии клеток рака поджелудочной железы человека PANC-1. Линии клеток приобретали в American Type Culture Collection (ATCC) (HCT 116, кат. № CCL-247 и PANC-1, кат. № CRL-1469) или Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (42 MG BA, кат. № ACC 431).

Клетки распределяли по флаконам T25 в количестве 1, 10⁶ клеток/флакон. Когда клетки прикрепля-

лись к поверхности, суспензию наночастиц HfO_2 из примера 1 в концентрации 800 мкМ (в случае НСТ 116) или 400 мкМ (в случае PANC-1 и 42 MG) добавляли на ночь (12-15 ч.) к клеткам перед использованием дозы излучения. Клетки культивировали с антибиотиками (среда с 1% пенициллина-стрептомицина).

Дозы рентгеновского излучения применяли при мощности дозы 1 Гр·мин⁻¹ с использованием источника рентгеновского излучения (320 кВ, X-RAD 320). Доза излучения для каждой линии клеток приведена в табл. 3.

Таблица 3. Дозы излучения для каждой линии клеток

Линия клеток	НСТ 116	42 MG BA	PANC-1
Дозы излучения	4 Гр	10 Гр	8 Гр
	6 Гр	15 Гр	

Линия клеток НСТ 116: клетки культивировали в течение 72 ч при 37°C и 5% CO_2 во влажной камере. Через 72 ч собирали супернатант клеток.

Линии клеток 42 MG BA и PANC-1: клетки культивировали в течение 96 ч при 37°C и 5% CO_2 во влажной камере. Через 96 ч супернатант клеток собирали и концентрировали с использованием фильтров Centricon.

HMGB1 количественно анализировали в супернатантах клеток с использованием набора для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) HMGB1 человека (такого как "набор для ELISA HMGB1" от IBL International, кат. № ST51011).

На фиг. 3 представлен HMGB1, высвобождающийся умирающими злокачественными клетками. HMGB1, высвобождающийся в супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастиц HfO_2 из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии (в виде 1 фракции), представлен в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем.

На фиг. 3А представлен HMGB1, высвобождающийся умирающими злокачественными клетками НСТ 116. Дозы излучения были равны 4 и 6 Гр. Данные представлены как среднее для 2 независимых экспериментов, осуществленных в трех параллелях и объединенных.

На фиг. 3В представлен HMGB1, высвобождающийся умирающими злокачественными клетками 42 MG BA. Дозы излучения были равны 10 и 15 Гр. Данные представлены как среднее для 2 независимых экспериментов, осуществленных в трех параллелях и объединенных.

На фиг. 3С представлен HMGB1, высвобождающийся умирающими злокачественными клетками PANC-1. Доза излучения была равна 8 Гр. Данные представлены как среднее для 2 независимых экспериментов, осуществленных в трех параллелях и объединенных.

Выводы.

Значительное повышение HMGB1, высвобождающегося умирающими злокачественными клетками, наблюдают в супернатант клеток, обработанных наночастицами оксида гафния из примера 1, при воздействии одной дозы излучения по сравнению с облучением в отдельности. Эти результаты подтверждают концепцию применения этих наночастиц или агрегатов наночастиц в качестве терапевтической вакцины в контексте лучевой терапии среди широкого диапазона злокачественных новообразований.

Пример 6. Секреция АТФ умирающими злокачественными клетками.

Секрецию АТФ умирающими злокачественными клетками исследовали с использованием линии клеток колоректального рака человека НСТ 116. Линию клеток НСТ 116 приобретали в American Type Culture Collection (ATCC) (НСТ 116, кат. № CCL-247).

Клетки распределяли по флаконам T25 в концентрации 2×10^6 клеток/флакон. Когда клетки прикреплялись к поверхности, наночастицы HfO_2 из примера 1 в концентрации 800 мкМ добавляли на ночь (12-15 ч.) к клеткам перед использованием дозы излучения. Клетки культивировали с антибиотиками (среда, содержащая 1% пенициллина-стрептомицина).

Одну дозу рентгеновского излучения 6 Гр применяли при мощности дозы 1 Гр·мин⁻¹ с использованием источника рентгеновского излучения (320 кВ, X-RAD 320).

Клетки культивировали в течение 9 ч при 37°C и 5% CO_2 во влажной камере. Через 9 ч собирали супернатант клеток.

Секрецию АТФ количественно анализировали в супернатантах клеток с использованием набора для биолюминесцентного анализа для измерения АТФ (такого как "ENLITEN® ATP Assay System" от Promega, кат. № FF2000).

На фиг. 4 представлена секреция АТФ умирающими злокачественными клетками НСТ 116. Секреция АТФ в супернатанте клеток, обработанных или необработанных суспензией наночастиц HfO_2 из примера 1 и подвергнутых или неподвергнутых лучевой терапии (6 Гр в виде 1 фракции), представлена в виде кратного изменения по сравнению с необработанным контролем (т.е. линией клеток НСТ 116 без облучения). Данные представлены как среднее для 3 независимых экспериментов, осуществленных в трех параллелях и объединенных.

Выводы.

Значительное повышение секреции АТФ умирающими злокачественными клетками наблюдают в

супернатанте клеток, обработанных наночастицами оксида гафния из примера 1, при воздействии одной дозы излучения по сравнению с облучением в отдельности. Эти результаты подтверждают концепцию применения этих наночастиц или агрегатов наночастиц в качестве терапевтической вакцины в контексте лучевой терапии.

Пример 7. Вакцинации анализ.

Как указано в статье под названием "Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death" (Oliver Kepp et al., *Oncolmmunology* 2014), золотой стандарт подхода для оценки способности конкретного стимула вызывать настоящую ICD основан на вакцинационных анализах. В этих условиях выбранные злокачественные клетки мыши подвергают *in vitro* воздействию индуктора иммуногенной гибели клеток (ICD) и, в конечном итоге, инъецируют их подкожно (s.c.) в бок (участок вакцинации) иммунокомпетентных сингенных мышей (теоретически 5-10 на группу). Через одну неделю мышам вводили живые злокачественные клетки того же типа, инокулируемые s.c. в противоположный бок (участок введения). Частоту возникновения и рост опухолей общепринятым образом подвергали мониторингу в обоих участках инъекции в течение 1-2 месяцев. Развитие неопластических очагов в участке вакцинации свидетельствует о том, что исследуемый стимул не способен вызывать гибель клеток (в тестируемых условиях) до степени, совместимой с индуцированием приобретенного иммунитета. И наоборот, в отсутствие опухолей в участке вакцинации способность исследуемого стимула стимулировать настоящую ICD обратно коррелирует с количеством неопластических очагов, развившихся в участке введения.

В этом случае для вакцинационного анализа выбирали клетки колоректального рака мыши СТ 26. Линию клеток приобретали в American Type Culture Collection (ATCC) (СТ26, кат. № CRL2638).

Клетки распределяли по флаконам Т300 в концентрации 10×10^6 клеток/флакон. Когда клетки прикреплялись к поверхности, суспензию наночастиц HfO_2 из примера 1 в концентрации 400 мкМ добавляли на ночь (12-15 ч.) к клеткам перед использованием дозы излучения. Клетки культивировали с антибиотиками (среда с 1% пенициллина-стрептомицина).

Дозы рентгеновского излучения применяли при мощности дозы 1 Гр·мин⁻¹ с использованием источника рентгеновского излучения (320 кВ, X-RAD 320). Одну фракцию 6 Гр применяли к клеткам, обработанным или необработанным NP HfO_2 из примера 1.

Клетки культивировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO_2 во влажной камере. Через 48 ч клетки собирали, промывали PBS перед трипсинизацией и $1 \cdot 10^6$ жизнеспособных клеток инъецировали подкожно в левый бок иммунокомпетентных мышей Balb/c. В случае контрольной группы 100 мкл PBS инъецировали подкожно в левый бок мыши.

Через семь дней мышам вводили необработанные живые клетки СТ26: $3 \cdot 10^5$ клеток инъецировали подкожно в правый бок мышей (фиг. 5). Частоту возникновения и рост опухолей подвергали мониторингу дважды в неделю в обоих участках инъекции в течение 47 дней (фиг. 6).

Выводы.

Через сорок семь (47) дней после вакцинации 66% мышей не имели опухолей в группе, обработанной NP HfO_2 из примера 1 и облученной в дозе 6 Гр, по сравнению с 33% мышей, подвергнутых только облучению в дозе 6 Гр. Значительное повышение количества мышей, не имевших опухолей, наблюдают при осуществлении вакцинации клетками, обработанными наночастицами оксида гафния из примера 1 и подвергнутыми воздействию одной дозы излучения, по сравнению с облучением в отдельности. Эти результаты подтверждают концепцию применения этих наночастиц или агрегатов наночастиц в качестве терапевтической вакцины в контексте лучевой терапии.

Эти данные свидетельствуют о способности наночастиц или агрегатов наночастиц по изобретению при подвергании лучевой терапии вызывать эффективную мобилизацию иммунной системы индивидуума по сравнению с лучевой терапией в отдельности.

Такой эффективный иммунный ответ, запускаемый с использованием наночастиц или агрегатов наночастиц по изобретению при подвергании лучевой терапии, представляет особенный интерес для выбранных групп пациентов, как правило, индивидуумов, страдающих метастазирующим злокачественным новообразованием и/или подвергаемых паллиативной лучевой терапии, индивидуумов, страдающих метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которых лучевая терапия была отклонена, индивидуумов, страдающих злокачественным новообразованием, которых не лечат (общепринятым образом) посредством лучевой терапии, или индивидуумов, страдающих гемобластомами.

Ссылки

- Dhara M. MacDermed et al. A rationale for the targeted treatment of oligometastases with radiotherapy. Journal of Surgical Oncology 2008. 98 202-206.
- Ralph R. Weichselbaum et al. Oligometastases revisited. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011. 8, 378-382.
- Sonam Sharma et al. Palliative radiotherapy: current status and future directions. Seminars on Oncology 2014. 41 (6) 751-763.
- Sandra Demaria and Silvia C. Formenti. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation. Frontiers in Oncology. October 2012 Volume 2 Article 153 1-7.
- Oliver Kepp. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. Oncoimmunology 2014 3(9) e955691.
- Kobe Reynders et al. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. Cancer Treatment Review 2015 41(6), 503-510.
- Scott J. Antonia et al. Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. Clinical Cancer Research; 20(24) 2014 6258-6268.
- Theresa L. Whiteside et al. Emerging opportunities and challenges in cancer immunotherapy. Clin Cancer Res 2016. 22(8) 1845-1855.
- Nicolle H. Rekers et al. Combination of radiotherapy with the immunocytokine L19-IL2: additive effect in a NK cell dependent tumour model. Radiotherapy and Oncology 2015, 116 438-442.
- Y. Suzuki et al. Immunogenic Tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Cancer Res. 2012.72(16) 3967-76.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественных новообразований за счет абскопального эффекта путем промотирования иммуногенной гибели злокачественных клеток у пациента, представляющего собой человека, страдающего обширным метастазирующим злокачественным новообразованием и подвергаемого паллиативной лучевой терапии, пациента, представляющего собой человека, страдающего обширным метастазирующим злокачественным новообразованием, в случае которого лучевая терапия была прекращена, или пациента, представляющего собой человека, страдающего обширным метастазирующим злокачественным новообразованием, которого не подвергают лечению посредством лучевой терапии, или пациента, представляющего собой человека, страдающего гемобластозом, включающий стадию введения вакцинной композиции, содержащей наночастицу и/или агрегат наночастиц, пациенту, представляющему собой человека, или в его образец злокачественного новообразования, и стадию подвергания пациента, представляющего собой человека, или его образца злокачественного новообразования, содержащего наночастицу и/или агрегат наночастиц, фракционной лучевой терапии, включающей по меньшей мере одну стадию облучения, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 30 Грей (Гр), и где каждая наночастица состоит из материала, имеющего плотность по меньшей мере 7 г/см³ и атомное число (Z) по меньшей мере 25, и каждая наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым покрытием, позволяющим им быть стабильными при pH от 6,5 до 7,5 в физиологической жидкости, и когда образец злокачественного новообразования подвергают фракционной лучевой терапии, стадию введения, по меньшей мере, частично, облученного образца пациенту, представляющему собой человека.

2. Способ по п.1, где доза ионизирующего излучения находится в диапазоне от 1,8 до 20 Грей (Гр).

3. Способ по п.1 или 2, где, если злокачественное новообразование является метастазирующим злокачественным новообразованием, по меньшей мере одну стадию облучения осуществляют *in vivo* в отношении одного, но не более двух, участков опухоли метастазирующего злокачественного новообразования, содержащих наночастицы или агрегаты наночастиц.

4. Способ по п.1 или 2, где, если злокачественное новообразование является метастазирующим злокачественным новообразованием, по меньшей мере одну стадию облучения осуществляют *ex vivo* в отношении образца злокачественного новообразования индивидуума, содержащего наночастицы или агрегаты наночастиц, и летально облученные *ex vivo* злокачественные клетки и, по меньшей мере, часть супернатанта клеток из образца злокачественного новообразования, по меньшей мере, частично, вводят индивидууму повторно перед каким-либо необязательным последующим *in vivo* лечением злокачественного новообразования у указанного индивидуума.

5. Способ по п.1 или 2, где, если злокачественное новообразование является гемобластомом, по меньшей мере одну стадию облучения осуществляют *ex vivo* на образце гемобластома индивидуума, содержащем наночастицы или агрегаты наночастиц, и облученный образец гемобластома, по меньшей мере, частично, вводят индивидууму повторно перед каким-либо необязательным последующим *in vivo* лечением злокачественного новообразования у указанного индивидуума.

6. Способ по п.5, где образец гемобластома является образцом крови или объемом цельной крови индивидуума.

7. Способ по любому из пп.4-6, где летально облученные *ex vivo* злокачественные клетки или облученный образец гемобластома, по меньшей мере, частично, вводят индивидууму повторно вместе по меньшей мере с одним дополнительным иммунотерапевтическим средством, при этом летально облученные *ex vivo* злокачественные клетки или облученный образец гемобластома и по меньшей мере одно дополнительное иммунотерапевтическое средство вводят индивидууму одновременно или раздельно.

8. Способ по любому из пп.1-7, где доза ионизирующего излучения выбрана из 1,8, 2, 2,4, 2,5, 3, 3,2, 3,6, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 10, 15 и 20 Гр на фракционное лечение.

9. Способ по любому из пп.1-8, где метастазирующее злокачественное новообразование поражает (i) соединительную ткань, и оно выбрано из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеосаркомы, хордомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, (ii) эндотелиальной или мезотелиальной ткани, и оно выбрано из гемангиосаркомы, ангиосаркомы, лимфангиосаркомы и мезотелиомы, (iii) мышечной ткани, и оно выбрано из лейомиосаркомы и рабдомиосаркомы, (iv) эпителиальной ткани, и оно выбрано из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы и эпидермоидной карциномы, (v) нервной ткани, и оно выбрано из мультиформной глиобластомы, глиомы, нейробластомы, медуллобластомы, менингиомы, нейрофибросаркомы и шванномы, и (vi) системы APUD, и оно выбрано из рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка и рака кишечника; или где метастазирующее злокачественное новообразование является меланомой.

10. Способ по п.9, где метастазирующее злокачественное новообразование является или развивается из злокачественного новообразования, выбранного из рака кожи, злокачественного новообразования центральной нервной системы, рака головы и шеи, рака легких, рака почки, рака молочной железы, злокачественного новообразования желудочно-кишечного тракта (GIST), рака предстательной железы, рака печени, рака толстого кишечника, рака прямой кишки, рака анального канала, рака пищевода, злокачественного новообразования мужской мочеполовой системы, злокачественного новообразования женской половой системы, рака надпочечников и рака забрюшинного пространства, сарком костной ткани и мягких тканей, злокачественных новообразований детского возраста, нейробластомы, злокачественного новообразования центральной нервной системы и саркомы Юинга.

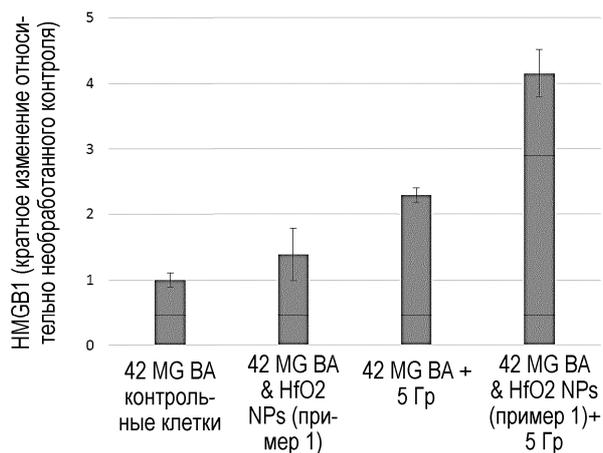
11. Способ по любому из пп.1-8, где гемобластом поражает кровь или лимфоидную ткань и выбран из лейкоза, миеломы и лимфомы.

12. Способ по любому из пп.1-11, где наночастицу или агрегат наночастиц вводят индивидууму, подвергнутому лечению, вместе по меньшей мере с одним иммунотерапевтическим средством, при этом наночастицу или агрегат наночастиц и по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство вводят индивидууму одновременно или раздельно.

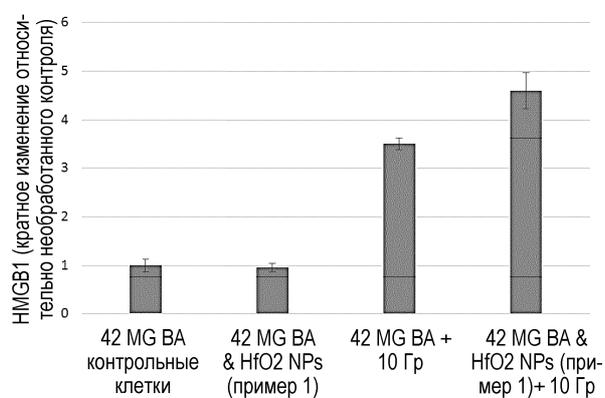
13. Способ по любому из пп.1-12, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ по п.13, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство.

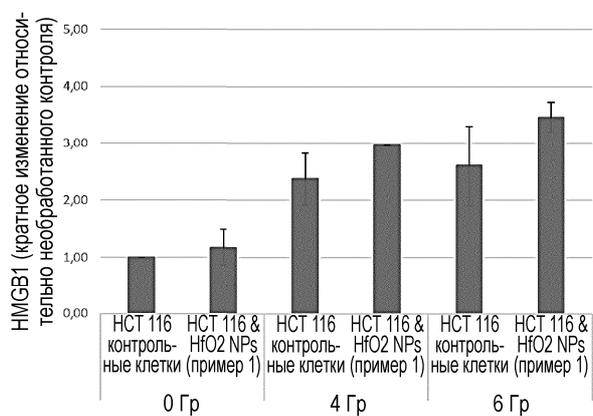
15. Способ по п.14, где по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство выбрано из моноклонального антитела, цитокина и их комбинации.



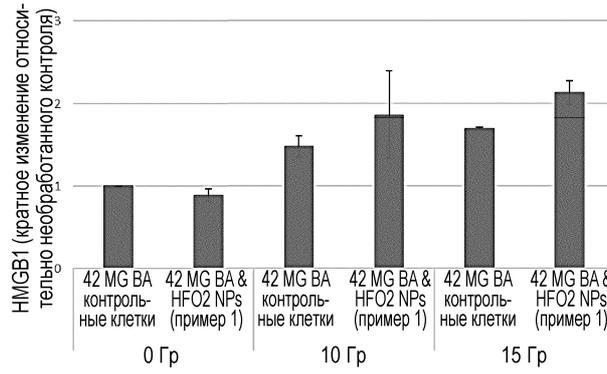
Фиг. 1



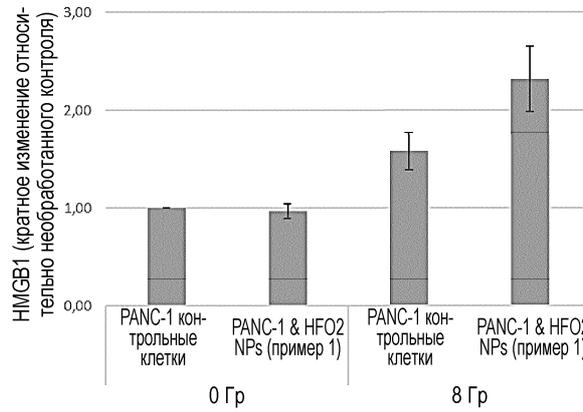
Фиг. 2



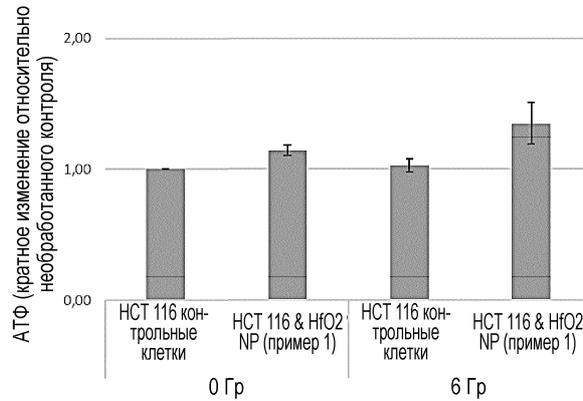
Фиг. 3А



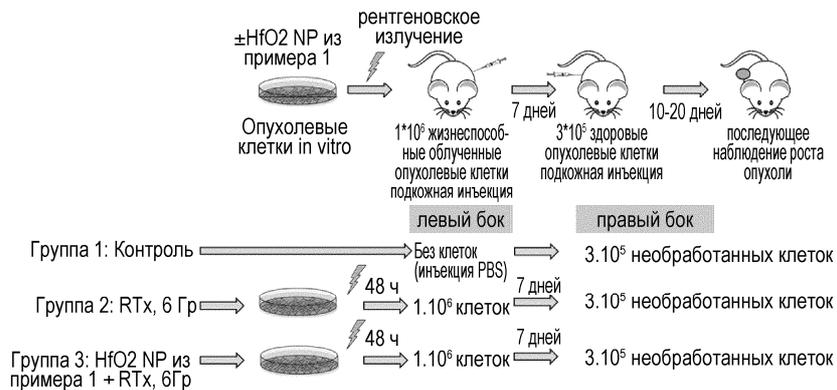
Фиг. 3В



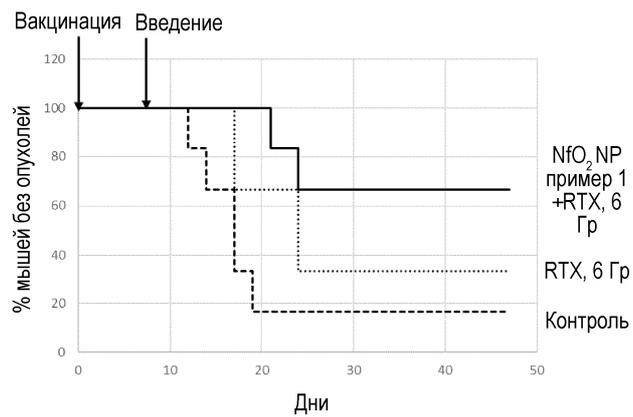
Фиг. 3С



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

