

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041972**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.21(21) Номер заявки
202091579(22) Дата подачи заявки
2018.12.17(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(54) **СОДЕРЖАЩИЕ ГАНГЛИОЗИД GM-3 НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ
ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ**(31) **2017-0173**(32) **2017.12.27**(33) **CU**(43) **2020.09.17**(86) **PCT/CU2018/050005**(87) **WO 2019/129313 2019.07.04**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИА
МОЛЕКУЛАР (CU)**

(72) Изобретатель:

**Меса Пардильо Сирсе, Оливер Риос
Лилиана, Альварес Арсола Ридель,
Пенья Санчес Владимир, Фернандес
Молина Луис Энрике, Вальдес Сайас
Анет, Рабаде Чедиак Маура Лизетт,
Агиар Гарсия Лена, Эрнандес Де
Ла Роза Лурдес, Фернандес Гомес
Одри, Перес Руис Леслье, Родригес
Родригес Камило, Грасия Медина
Элиас Антонио, Рубио Эрнандес
Мария Каридад, Вальдес Герреро
Орландо, Курбело Аредия Идельмис
(CU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)(56) **US-A-6149921**

VLADIMIR MULENS ET AL.:
"Immunogenicity and safety of a NeuGcGM3 based
cancer vaccine: Results from a controlled study
in metastatic breast cancer patients.", HUMAN
VACCINES, vol.6, no.9, 1 de Septiembre de 2010
(2010-09-01), paginas 736-744.XP055570530, US
ISSN: 1554-8600, DOI: 10.4161/hv.6.9.12571 pagina
736 resumen pagina 742, columna derecha, parrafo 6
EP-A2-1356822

CARR A. ET AL.: "Immunotherapy of
advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside
(NeuGcGM3) cancer vaccine", JOURNAL OF
CLINICAL ONCOLOGY 20030315 L vol.21, no.6,
15 de Marzo de 2003 (2003-03-15) , paginas
1015-1021,XP002790510, ISSN: 0732-183X pagina
1015 resumen pagina 1016, columna derecha, parrafo
2

"BioCubaFarma: accelerating the development
of cancer immunotherapies", Septiembre
2018 (2018-09),XP002790511, Recuperado de
internet:URL:https://biopharmadealmakers.
nature,
com/users/114910-biocuba-farma/documents/38662-
biocubafarma-sept-2018 [recuperado el
2019-03-18]todo el documento

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, активный ингредиент которой включает конъюгаты мембранных везикул *Neisseria meningitidis* и ганглиозида GM3 в соотношении конъюгации с избытком белков, имеет особые характеристики размера, поверхностного заряда и морфологии, связанные с системами наночастиц, которые придают ему полезные свойства в качестве иммуномодулятора, поскольку он индуцирует удобное и значительное уменьшение супрессорных клеток миелоидного происхождения, что влияет на ответ Т-лимфоцитов и на выживаемость пациентов с опухолями. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению раскрытой фармацевтической композиции при лечении рака, в частности тех раковых заболеваний, где уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSCs) являются высокими; а также к способу лечения указанной композицией больных раком и способу выбора тех, кто будет получать указанное лечение.

B1**041972****041972 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к областям иммунонано технологий и иммуноонкологии, в частности к иммуномодуляторам для лечения индивидуумов, страдающих раком и/или хроническими инфекциями. В частности, в настоящем изобретении раскрыт наночастичный иммуномодулятор, специализирующийся на специфичном воздействии на супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSCs) у этих индивидуумов, а также восстановлении Т-клеточного иммунного ответа.

Уровень техники

В последнее время важные клинические результаты были получены с использованием антител (Abs), ингибирующих контрольную точку иммунного ответа, обладающих способностью вызывать долгосрочные объективные ответы, оказывающие значительное влияние на выживаемость пациентов. Эти методы лечения, которые модулируют иммунную систему и восстанавливают способность пациента разрушать опухолевые клетки, привели к возрождению иммунотерапии рака с особым акцентом на разработку новых иммуномодуляторов.

Однако существуют и другие пути подавления противоопухолевого иммунного ответа, которые являются важными мишенями для разработки новых иммуномодуляторов (Malmberg K.J. et al. (2004) *Cancer Immunol Immunother* 53 (10): 879-92). Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSCs) составляют одну из основных клеточных популяций, мобилизованных опухолями, обладающих способностью подавлять иммунный ответ (Mantovani A. et al. (2010) *Curr Opin Immunol* 22 (2): 231-7; Condamine T. et al. (2011) *Trends Immunol* 32 (1): 19-25). В частности, как указано Shipp et al., в обзорной статье частота циркулирующих МЛСК является фактором плохого прогноза у пациентов с опухолями самых разных органов и тканей. Кроме того, высокий уровень циркуляции в этих популяциях связан с меньшим преимуществом традиционных методов лечения, таких как химиотерапия, радиотерапия и даже применение Abs против контрольных точек (Shipp C. et al. (2016) *Cell Mol Life Sci* 73(21): 4043-61). У людей в качестве общего консенсуса описаны три популяции MDSC: MDSCs ранней стадии (eMDSC), определяемые как $LN^+CD11b^+CD33^+HLA-DR^-$; моноцитарные MDSCs (mMDSC), определенные как $CD14^+HLA-DR^{низ./-}$ и гранулоцитарные MDSCs (gMDSC), с фенотипом $CD11b^+CD33^+CD14^+CD15^+$ ($CD66b^+$) (Bronte V. et al. (2016) *Nat Commun* 7: 12150). Все три популяции считаются супрессорами опухолеспецифического иммунного ответа (Shipp C. et al. (2016) *Cell Mol Life Sci* 73 (21): 4043-61).

Стратегии исследований, которые в настоящее время разрабатываются для противодействия иммуносупрессии, индуцированной MDSCs, сосредоточены на трех подходах:

- (1) уменьшить их количество,
- (2) повлиять на их функцию и
- (3) повлиять на их дифференцировку.

В этих направлениях уже были получены обнадеживающие результаты в отношении нескольких из оцениваемых лекарственных препаратов (Najjar Y. G. et al. (2013) *Frontiers in Oncology* 3 (49): 1-9).

Особенно релевантными для настоящего изобретения в рамках терапевтических стратегий, нацеленных на MDSCs, являются стратегии, основанные на системах с наночастицами. Известно, что наночастицы имеют широкий спектр применения, и что в зависимости от размера и характеристик поверхности они ведут себя по-разному *in vivo*. Размер, например, влияет на место локализации, а характеристики поверхности влияют на механизмы адгезии и захвата (Wilkerson A. et al. (2017) *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17: 1843-57). В этом смысле, как сообщает Serda R.E., системы частиц диаметром от 500 до 2000 нм преимущественно захватываются в месте инъекции и перемещаются в лимфатические узлы (ЛУ), тогда как частицы диаметром от 20 до 200 нм пассивно проникают в ЛУ, где они взаимодействуют с резидентными клетками (Serda R.E. (2013) *Int J of Nanomed* 8:1683-1696).

К настоящему времени было описано только шесть основанных на наночастицах стратегий, влияющих на MDSCs, среди которых: наночастицы, нагруженные гемцитабином, наночастицы, нагруженные хемокином CCL21, наночастицы, нагруженные CpG, липосомы, нагруженные полностью транс-ретиноевой кислотой, и наночастицы, созданные с использованием глюкозана (Wilkerson A. et al. (2017) *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17:1843-57). Эти пять стратегий имеют три фундаментальные характеристики: размер наночастиц находится в диапазоне от 30 до 250 нм, их использование ограничено мышинными моделями, и они представляют собой частицы, которые сами по себе не влияют на MDSCs, но они являются системами-носителями биологического агента.

Шестой стратегией, основанной на системе наночастиц, с воздействием на MDSCs, является использование очень мелких протеолипосом (VSSP), которые содержат ганглиозид GM3. Эти препараты можно рассматривать как техническое решение, наиболее близкое к настоящему изобретению. Первоначально Molina et al. патенте США № 8591917B2 описывали способ стимуляции иммунного ответа у субъектов при помощи вводимым подкожно VSSP. Кроме того, исследования Fernandez et al. and Oliver et al. показали, что у здоровых мышей с опухолями или мышей с вызванной химиотерапией лейкопенией введение VSSP вызывает в селезенке значительное увеличение клеток с фенотипом, сходным с фенотипом MDSCs, но с заметно сниженной подавляющей способностью (Fernandez A. et al. (2011) *J Immunol* 186: 264-74; Oliver L. et al. (2012) *Vaccine* 30: 2963-72). В других исследованиях также описывается, что применение VSSP у мышей с опухолями предотвращает перекрестную презентацию антигенов MDSCs,

индуцированную опухолью, и индуцирует их дифференцировку в антигенпрезентирующие клетки (Fernandez A. et al. (2014) *J Immunotherapy of Cancer* 2:5). Способ получения этих VSSP описан Rodriguez et al. в патенте США № 6149921, в котором подчеркивается, что конъюгат белков *Neisseria meningitidis* смешивается с избытком ганглиозида GM3 в присутствии детергента, который затем удаляется методом диализа. Кроме того, Estevez et al. описывают, что после диализа происходит процесс ультрацентрифугирования, который удаляет конъюгаты с большей массой и размером (Estevez F. et al. (2000) *Vaccine* 18: 190-7).

Новое активное вещество иммуномодулирующего препарата, описанного в настоящем изобретении, также включает конъюгаты мембранных везикул *N. meningitidis* и ганглиозида GM3. Этот препарат имеет особые характеристики размера, поверхностного заряда и морфологии, связанные с системой наночастиц, которые никогда ранее не были описаны ни в каком техническом решении или в предыдущей научной публикации. Эти характеристики наделяют настоящее изобретение преимущественными и неожиданными свойствами с точки зрения их влияния на MDSCs по сравнению с теми решениями, которые ранее были описаны в Fernandez A. et al. и Oliver L. et al. Препарат по настоящему изобретению, предпочтительно вводимый подкожно для лечения пациентов с опухолями, и вопреки сведениям из предшествующего уровня техники, вызывает удобное и значительное уменьшение gMDSCs и mMDSCs и оказывает влияние на ответ Т-лимфоцитов и выживаемость получивших лечение пациентов. Следовательно, новизна настоящего изобретения состоит в создании нового иммуномодулятора с эффектом снижения уровней MDSCs у пациентов с опухолями.

Краткое описание изобретения

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для иммуномодуляции иммунного ответа у онкологических пациентов, содержащей наночастицы, образованные гидрофобным конъюгированием комплекса белков наружной мембраны (ОМРС) бактерии *N. meningitidis* с ганглиозидом GM3, где соотношение конъюгации белок-ганглиозид находится в диапазоне от 1,5:1 до 10:1.

В частности, указанная композиция характеризуется мономодальным распределением размера частиц в диапазоне от 15 до 25 нм, индексом полидисперсности 0,230, отрицательным Z-потенциалом с номинальным значением в диапазоне от 25 до 45 мВ.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, являющейся объектом настоящего изобретения, для лечения рака, и, в частности, в качестве иммуномодулятора MDSCs у пациентов с раковыми заболеваниями, которые увеличивают присутствие этих клеток.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нуждающегося в этом субъекта, включающему введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении, путем подкожного, внутрикожного, внутримышечного, внутриопухолевого введения или путем прямого нанесения на слизистые оболочки с еженедельной частотой в общей сложности в количестве по меньшей мере четырех доз, а затем введения поддерживающих доз раз в две недели или в месяц в течение по меньшей мере шести месяцев.

В конкретном варианте осуществления изобретения объектом настоящего изобретения является способ отбора онкологических пациентов в качестве кандидатов для получения лечения описанной фармацевтической композицией, который включает: извлечение образца крови и/или опухолевой ткани у пациента и определение уровней MDSCs в указанном образце крови и/или опухолевой ткани. Пациенты, которые имеют высокую частоту или высокое абсолютное количество MDSCs в крови или те, у кого был положительный результат в отношении степени инфильтрации MDSCs в опухолевой ткани, будут рассматриваться в качестве кандидатов для такого лечения.

Подробное описание изобретения

Иммуномодулирующая композиция.

Настоящее изобретение относится к иммуномодулирующей системе, которая значительно уменьшает количество циркулирующих MDSCs у тех онкологических пациентов, у которых высокий уровень этих клеток циркулирует в крови или имеет мест в опухоли. Иммуномодулирующая система может быть определена как система, способная устранять или модулировать любой из подавляющих медиаторов иммунного ответа, как в случае MDSCs.

Иммуномодулирующий объект, заявленный в настоящем изобретении, состоит из наночастиц, полученных из наружной мембраны грамотрицательной бактерии *N. meningitidis*, связанной с ганглиозидом GM3. Данное изобретение предусматривает, что ОМРС *N. meningitidis* сначала диспергируют в буферном растворе трис-HCl, содержащем смесь дезоксихолата натрия (10-40 мМ) и додецилсульфата натрия (1-10 мМ), в реакторе с перемешиванием в течение периода времени от 1 до 36 ч.

Затем добавляют массу ганглиозида GM3 в 0,6-10 раз меньше, чем добавленная масса ОМРС, так что соотношение белок:ганглиозид составляет от 1,5:1 до 10:1, и продолжают перемешивание. Образование наночастиц достигается за счет использования системы тангенциальной фильтрации с мембранами от 10 до 100 кДа и трансмембранным давлением от 115 до 175 кПа, так что детергенты полностью удаляются. Ультрафильтрованный остаточный раствор ультрацентрифугируют при 100000 g и концентри-

руют для доведения его концентрации до желаемой дозы от 0,1 до 2 мг/мл ОМРС и стерилизуют фильтрацией в стерильной капсуле с размером пор 0,2 мкм.

Путем конъюгации при соотношении массы белка и ганглиозида, смещенном к количеству белка, и процесса тангенциальной ультрафильтрации в контролируемых условиях получали препарат с определенными характеристиками, который получил название VSSP-iMod. Анализ морфологии, размера и поверхностной плотности заряда частиц показывает наличие гетерогенной композиции в виде наночастиц размером от 15 до 25 нм и с отрицательным Z-потенциалом номинального значения в диапазоне от 25 до 45 мВ.

Способы идентификации и/или отбора пациентов для лечения с применением VSSP-iMod.

Для отбора пациентов, которым будет вводиться VSSP-iMod, определяли уровень gMDSC и mMDSC, которые могут подавлять Т-специфический ответ на опухоли.

Увеличение MDSCs из-за присутствия опухоли может быть определено путем оценки различных субпопуляций этих клеток в кровотоке или в микроокружении опухоли. Кроме того, их присутствие подразумевает увеличение определенных белков плазмы и циркулирующей ДНК. Источники образцов для оценки включают образцы периферической крови и опухоли, которые включают без ограничений биопсию опухоли, циркулирующие белки плазмы, асцитную жидкость и циркулирующую ДНК.

Увеличение этих клеток можно определить с помощью диагностического или прогностического анализа с использованием проточной цитометрии, иммуногистохимии (ИГХ), ИФА, иммунофлуоресценции или полимеразной цепной реакции. С другой стороны, пациент, у которого нет повышенных уровней MDSC из-за стадии или локализации имеющейся у него опухоли, является тем пациентом, у которого уровни выше, чем у нормальных здоровых доноров, но который не имеет значительных уровней, наблюдаемых у пациентов с той же патологией.

Определение уровней MDSCs в образцах крови пациентов проводят с помощью проточной цитометрии, где обе популяции анализируют в области FSC^{промежуточное/высокое}/SSC^{низкое/высокое}. В частности, для популяции gMDSC выбрана двойная положительная популяция для CD11b и CD33, и в ней субпопуляция положительная для CD66b и отрицательна для CD14. Для mMDSC отбирается популяция с отрицательной или низкой экспрессией HLA-DR и положительной по CD14. На основании этих результатов и в связи с тем же определением для здоровых доноров, сопоставимых по возрасту и полу, уровни MDSC можно классифицировать следующим образом в соответствии с их частотой или абсолютным количеством:

отрицательный: значения в процентах и/или числах в диапазоне, определяемом средним нормальных значений (M) ± стандартное отклонение с доверительной вероятностью 95%;

слабый: значения в процентах и/или числах $2M \leq \text{MDSC} < 3M$ по отношению к M;

высокий: значения в процентах и/или числах со значениями $3M \leq \text{MDSC}$.

Пациенты с высокой частотой или абсолютным количеством MDSC в крови будут подлежать лечению с применением VSSP-iMod.

Для определения уровней MDSCs в образцах опухолевых тканей можно использовать методику ИГХ для CD33⁺ клеток. Для этого необходимо определить процент CD33⁺ клеток в ткани, который выражается следующим образом:

отрицательный: менее 10% положительных клеток;

положительная/низкая инфильтрация MDSCs: от 10 до 19% положительных клеток;

положительная/высокая инфильтрация MDSCs: более 20% положительных клеток В зависимости от ее гистологического типа и стадии, можно считать, что опухоль;

рекрутирует MDSCs при условии, что она является положительной в отношении степени ее инфильтрации CD33⁺ клетками.

Терапевтическое применение и способы лечения.

Настоящее изобретение относится к иммуномодулирующей композиции, специализирующейся на уменьшении MDSCs как фенотипа gMDSC, так и mMDSC, которая является решением, представляющим особый интерес для иммуноонкологии, где известно, что MDSCs представляют собой существенный супрессорный узел противоопухолевого иммунного ответа.

Прогрессирование некоторых опухолей сопровождается рекрутированием в место опухоли MDSCs, для которых были описаны специальные механизмы подавления противоопухолевого иммунного ответа Т- и NK-лимфоцитов. Настоящее изобретение предполагает, что у тех пациентов, которые имеют повышенный уровень gMDSC и/или mMDSC в кровотоке и/или в опухоли, количество этих клеток может быть значительно снижено путем лечения с применением VSSP-iMod. Это снижение приведет к тому, что у этих пациентов естественный противоопухолевый иммунный ответ или иммунный ответ, индуцированный какой-либо терапией, не будет подавляться MDSCs, что приведет к выживанию получивших такое лечение пациентов.

Иммуномодулятор VSSP-iMod настоящего изобретения может быть введен пациенту путем подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутритуморозного введения или путем непосредственного нанесения на слизистые оболочки.

К числу типов рака, которые можно лечить с помощью иммуномодулятора VSSP-iMod, являющегося объектом настоящего изобретения, относятся те типы, для которых сообщалось, что они рекрутируют MDSCs в качестве иммуносупрессивного механизма противоопухолевого иммунного ответа. Более конкретно, примеры этих видов рака включают меланому, рак предстательной железы, рак головы и шеи, рак яичников, рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфолейкоз, плоскоклеточный рак пищевода, лимфому Ходжкина, рак почки и рак молочной железы.

Диапазон доз иммуномодулятора VSSP-iMod для применения у людей составляет от 100 мкг до 2 мг, предпочтительно от 200 мкг до 1200 мкг (в зависимости от содержания ОМРС).

Указанный иммуномодулятор вводят субъектам с еженедельной частотой в общей сложности в количестве по меньшей мере четырех доз, чтобы достичь быстрого снижения MDSC, а затем вводят поддерживающие дозы каждые две недели или ежемесячно в течение по меньшей мере шести месяцев. Это лечение может проводиться хронически до тех пор, пока пациенту это необходимо.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется следующими примерами и чертежами. Однако эти примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. В эти примеры включены экспериментальные данные, которые позволяют проверить конкретные физико-химические характеристики VSSP-iMod и его эффективность в отношении снижения содержания MDSCs у получавших лечение пациентов. Кроме того, примеры показывают влияние этого снижения на ответ Т-лимфоцитов, а также на выживаемость получавших лечение пациентов.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - оценка методом фотонной корреляционной спектроскопии диаметра частиц VSSP-iMod.

Фиг. 2 - оценка методом фотонной корреляционной спектроскопии Z-потенциала частиц VSSP-iMod.

Фиг. 3 - изображение морфологии частиц VSSP-iMod, полученное при помощи атомно-силовой микроскопии.

Фиг. 4 - оценка с помощью проточной цитометрии эффекта лечения с применением VSSP-iMod у пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком (мПКР):

- a) частота gMDSC и
- b) процент пациентов с частотой gMDSC выше и ниже среднего значения.

Фиг. 5 - оценка с помощью проточной цитометрии влияния лечения с применением VSSP-iMod на способность MDSCs подавлять пролиферацию:

- a) TCD4⁺ лимфоцитов и
- b) TCD8⁺ лимфоцитов.

Фиг. 6 - оценка с помощью проточной цитометрии влияния лечения с применением VSSP-iMod у пациентов с карциномой молочной железы на:

- a) частоту и % пациентов с частотой gMDSC выше и ниже среднего значения,
- b) частоту и % пациентов с частотой mMDSC выше и ниже среднего значения.

Фиг. 7 - определение с помощью проточной цитометрии влияния лечения с применением VSSP-iMod на абсолютное количество TCD8⁺ лимфоцитов у пациентов с карциномой молочной железы.

Примеры

Пример 1. VSSP-iMod имеет определенный размер и поверхностный заряд.

Размер в нанометрах и Z-потенциал частиц, составляющих VSSP-iMod, были измерены с помощью фотонной корреляционной спектроскопии. Образцы оценивали в трех повторностях, размер и значения Z-потенциала были получены с использованием алгоритмов CONTEST и Smoluchowski, соответственно. Как показано на фиг. 1, VSSP-iMod показал мономодальное распределение в диапазоне от 15 до 25 нм по объемному распределению с коэффициентом полидисперсности (PDI) 0,230, что означает, что препарат является гетерогенным по составу частиц. Кроме того, VSSP-iMod показал отрицательный Z-потенциал, и его номинальное значение находилось в диапазоне от 25 до 45 мВ, как показано на фиг. 2.

Пример 2. Морфология наночастиц VSSP-iMod.

Изображения VSSP-iMod получали в многомодовом атомно-силовом микроскопе с использованием кремниевго кантилевера. 50 мкл образца наносили на слюду, предварительно функционализированную раствором хлорида никеля с концентрацией 50 моль/л. Перед нанесением на слюду VSSP-iMod разбавляли трис-буферным раствором (концентрация 10 ммоль/л, pH 8,5) в соотношении 1/10. Изображение на фиг. 3 показывает гетерогенную композицию, состоящую из наночастиц сферической структуры порядка десятков нанометров, что полностью соответствует результату, полученному с помощью фотонной корреляционной спектроскопии.

Пример 3. VSSP снижает частоту и супрессивную активность MDSCs у пациентов с мПКР.

Оценивали влияние VSSP-iMod на MDSCs у пациентов с мПКР. С этой целью пятнадцать пациентов с этим диагнозом получали 400 мкг VSSP-iMod, вводимого подкожно в дельтовидную область. В общей сложности четыре дозы VSSP-iMod вводили с еженедельной частотой, а затем ежемесячно вводили поддерживающие дозы до завершения 6 месяцев лечения. В этом анализе частоту gMDSC оценивали с помощью проточной цитометрии. С этой целью было проанализировано в общей сложности 200000

клеток и было определено процентное содержание gMDSC путем измерения фенотипа CD11b⁺/CD66b⁺/CD14⁻ в общем количестве МКПК. В качестве контроля оценивали частоту gMDSC у 15 здоровых доноров того же возраста и пола. Как видно на фиг. 4а, VSSP-iMod уменьшал частоту циркулирующих gMDSC у пациентов через 21 день или три дозы после начала лечения. Из уровня техники известно, что пациенты, у которых количество gMDSC ниже среднего значения, установленного для пациентов в определенных местах, имеют значительно более высокую выживаемость, чем те пациенты, у которых уровни gMDSC выше этого значения (Shipp C. et al. (2016) Cell, Mol.Life, Sci. 73 (21): 4043-61). Анализ процента пациентов с частотой gMDSC выше и ниже среднего значения показан на фиг. 4б. Как можно наблюдать после лечения с применением VSSP-iMod, только примерно 20% получавших лечение пациентов поддерживали высокий уровень MDSCs. Этот результат сохранялся на 147-й день или после пятого месяца, что указывает на то, что этот эффект VSSP-iMod сохраняется на протяжении всего лечения.

У этих пациентов последствия для ответа Т-лимфоцитов в результате воздействия VSSP-iMod на MDSCs также оценивали в эксперименте по пролиферации с помощью проточной цитометрии. В качестве исходного материала использовали в общей сложности 40×10^6 клеток из МКПК указанных пациентов. CD11b⁺ клетки очищали с использованием магнитных частиц, конъюгированных с CD11b-специфичным Ab. CD11b-отрицательную фракцию метили CFSE и культивировали отдельно или с CD11b⁺ клетками в соотношении 5:1 в течение 96 ч. На фиг. 5 показан относительный процент пролиферации Т-лимфоцитов в день 0 и в день 21 после введения VSSP-iMod у пациентов с ПКР. Как видно на фиг. 5а, пролиферация TCD4⁺ лимфоцитов увеличивается на 21 день, эффект, аналогичный наблюдаемому у TCD8⁺ лимфоцитов (фиг. 5б), что означает, что VSSP-iMod способен модулировать опосредованное MDSC подавление пролиферации Т-клеток у пациентов с ПКР.

Большинство пациентов, включенных в исследование, показали хорошее качество жизни в конце лечения, как установлено в протоколе, было решено продолжить ежемесячную иммунизацию. Продление лечения поддерживало уровень gMDSC ниже средних значений в нулевой день, а медиана выживаемости всех пациентов в этом исследовании составляла 37,5 месяцев (табл. 1). Эта величина намного выше, чем историческая медиана 6,6 месяца, сообщенная для аналогичных пациентов, получавших интерферон, который в настоящее время является стандартом лечения на Кубе. Кроме того, в руководствах по клинической практике для мПКР Национальной всеобщей онкологической сети (NCCN) пациенты классифицируются по моделям Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга (MSKCC), как имеющие благоприятный, промежуточный и плохой прогноз. В этих руководствах указывается, что пациенты с мПКР, получавшие терапию против фактора роста эндотелия сосудов, имеют медиану выживаемости 27 месяцев в случае тех, у кого диагностирован промежуточный прогноз, тогда как 75% из тех, у кого диагностирован благоприятный прогноз, остаются живы через 24 месяца. Относительное сравнение значений, указанных в руководствах, с данными, полученными при применении VSSP-iMod, указывает на то, что влияние VSSP-iMod на gMDSCs также привело к выживаемости, превышающей стандарт, нормированный в руководствах NCCN. В исследовании VSSP-iMod 100% пациентов с благоприятным прогнозом были живы через 36 месяцев, а пациенты с промежуточным прогнозом имели медиану выживаемости 42 месяца.

Таблица 1. Выживаемость пациентов с мПКР, получавших VSSP-iMod

Пациент	Общее количество полученных доз	Выживание от момента включения в испытание (месяцы)	Прогноз по MSKCC при включении
ПКР 01	38	64,47	Благоприятный
ПКР 02	8	5,2	Плохой
ПКР 03	38	64,47	Промежуточный
ПКР 04	5	2,57	Плохой
ПКР 05	8	30,07	Промежуточный
ПКР 06	12	37	Промежуточный
ПКР 07	2	5,9	Плохой
ПКР 08	16	59,37	Промежуточный
ПКР 09	16	54,07	Благоприятный
ПКР 10	37	48	Промежуточный
ПКР 11	16	43,6	Благоприятный
ПКР 12	41	36,5	Благоприятный
ПКР 13	24	36,5	Промежуточный
ПКР 14	4	2,17	Плохой
ПКР 15	12	10,3	Плохой

Пример 4. VSSP снижает частоту MDSCs моноцитарного и гранулоцитарного фенотипа у пациентов с карциномой молочной железы.

Влияние VSSP-iMod на MDSCs также оценивали у пациентов с карциномой молочной железы. С этой целью было разработано исследование "окна возможностей" фазы 0, в котором пациенты получали 400 мкг VSSP-iMod с еженедельной частотой в течение трех недель путем подкожного введения в дельтовидную область. Это лечение проводилось в обычное время, установленное между диагнозом и началом стандартного лечения хирургического вмешательства или химиотерапии, назначенного врачом. В этом исследовании частоту gMDSCs, mMDSCs и CD8 T-клеток определяли при помощи проточной цитометрии. Всего было проанализировано 200000 клеток, и было определено процентное содержание gMDSC и mMDSC с использованием фенотипов CD11b⁺/CD66b⁺/CD14⁻ и CD11b⁺/CD14⁺/HLA-DR^{низ./отриц.}, в общем количестве МКПК, соответственно. Как видно на фиг. 6а, VSSP-iMod снижал частоту циркулирующих gMDSC, и такое же действие наблюдалось в отношении mMDSC (фиг. 6б), циркулирующих у пациентов, после 21 дня лечения. Кроме того, анализ процента пациентов с частотой gMDSCs и mMDSC выше и ниже среднего значения показал, что после лечения с применением VSSP-iMod только 15% и 0% пациентов, получавших лечение, сохраняли высокий уровень gMDSC и mMDSC соответственно. Это лечение также увеличило частоту CD8⁺ T-клеток в крови пациентов (фиг. 7).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая наночастицы, образованные гидрофобным конъюгированием комплекса белков наружной мембраны (ОМРС) бактерии *Neisseria meningitidis* с ганглиозидом GM3, где соотношение конъюгации белок-ганглиозид находится в диапазоне от 1,5:1 до 10:1, и где фармацевтическая композиция характеризуется мономодальным распределением размера частиц в диапазоне от 15 до 25 нм, индексом полидисперсности 0,230, отрицательным Z-потенциалом с номинальным значением в диапазоне от 25 до 45 мВ.

2. Применение фармацевтической композиции по п.1 в лечении рака.

3. Применение фармацевтической композиции по п.1 для снижения количества супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) у онкологических пациентов.

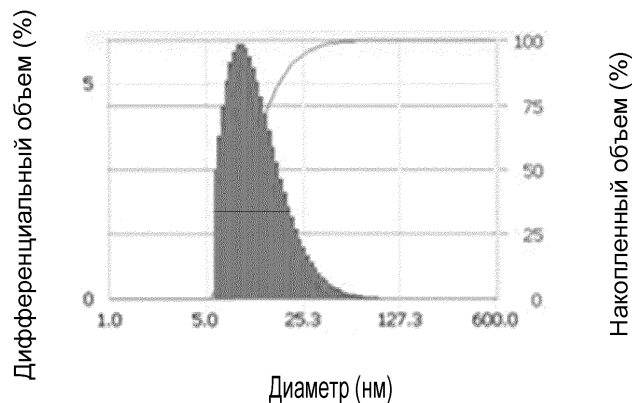
4. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий подкожное введение фармацевтической композиции по п.1 в дозе 400 мкг с еженедельной частотой в общей сложности в количестве по меньшей мере четырех доз, а затем введения поддерживающих доз раз в две недели или в месяц в течение по меньшей мере шести месяцев.

5. Способ отбора онкологических пациентов в качестве кандидатов для получения лечения фармацевтической композицией по п.1, который включает:

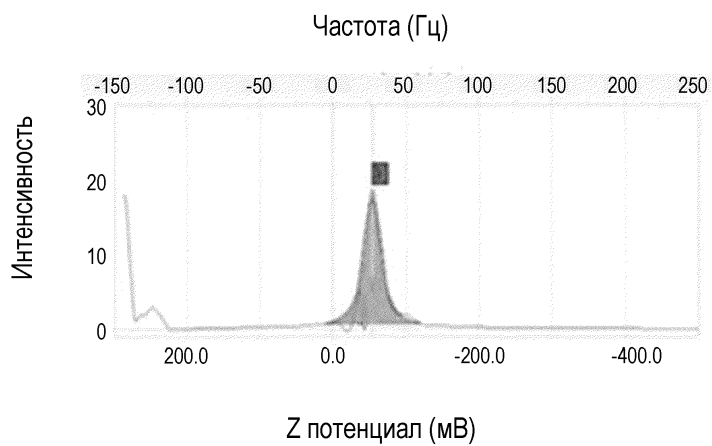
i) извлечение образца крови и/или опухолевой ткани у пациента и

ii) определение уровней MDSC в указанном образце крови и/или опухолевой ткани;

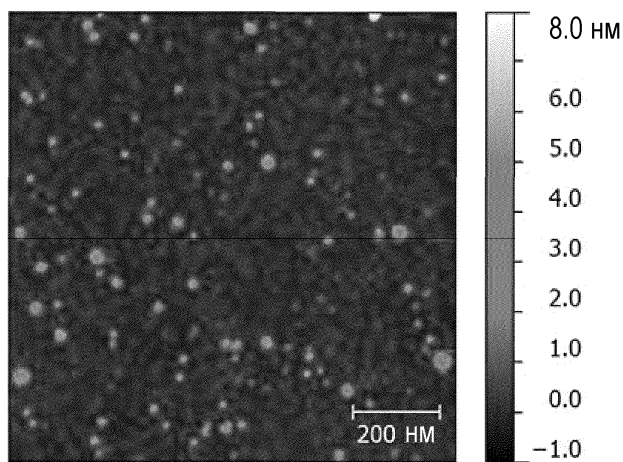
где пациенты отбираются если среднее значение частоты или абсолютного количества MDSC в крови равно или выше более чем в три раза нормальных значений, или процентное содержание клеток CD33⁺ в ткани составляет более чем 20%.



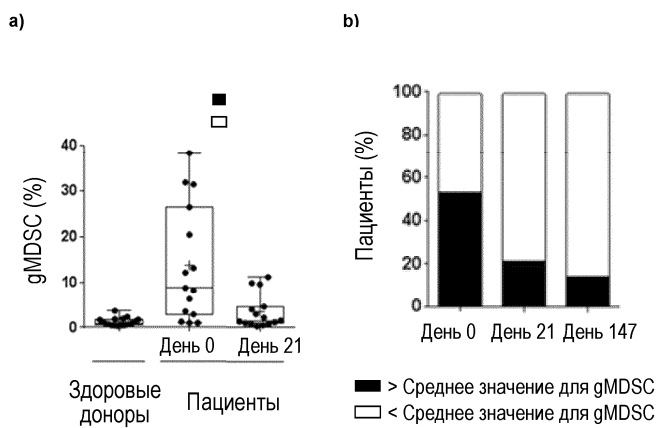
Фиг. 1



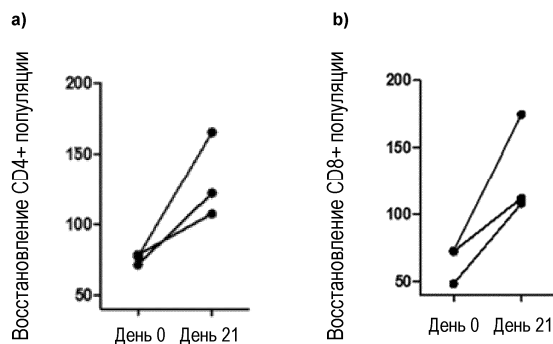
Фиг. 2



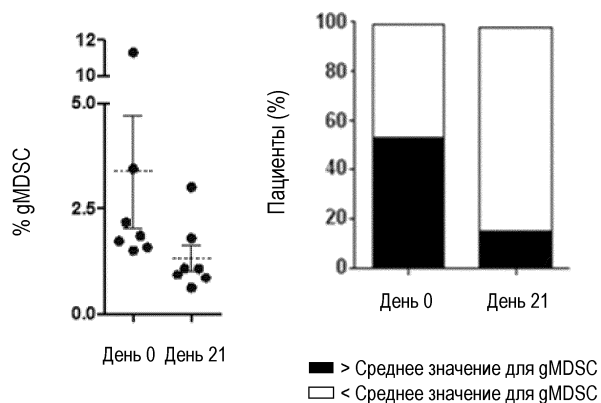
Фиг. 3



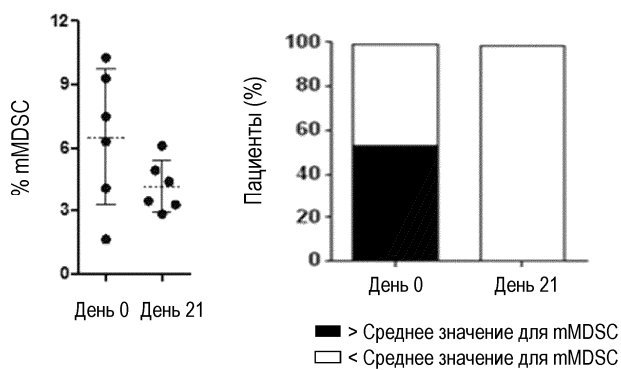
Фиг. 4



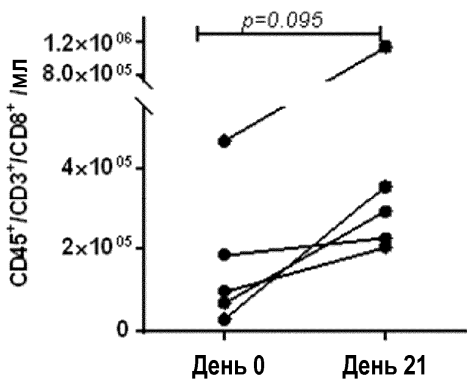
Фиг. 5



Фиг. 6а



Фиг. 6б



Фиг. 7