



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.09

(21) Номер заявки
202091116

(22) Дата подачи заявки
2018.10.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) НАНОЧАСТИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ГАНГЛИОЗИДА GM3, В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТОВ В ВАКЦИНАХ

(31) CU-2017-0137

(32) 2017.11.06

(33) CU

(43) 2020.09.24

(86) PCT/CU2018/050003

(87) WO 2019/086056 2019.05.09

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

(72) Изобретатель:
**Фернандес Молина Луис Энрике,
Санчес Рамирес Белинда, Фернандес
Гомес Одри, Бергадо Баэс Гретчен,
Меса Пардильо Сирсе, Чао Гарсия
Лиссет, Гонсалес Суарес Нархара,
Перес Мартинес Дайяна, Эрнандес
Фернандес Диана Роса, Крус Родригес
Мабель, Мансо Варгас Анхель
Алексис, Верес Бенкомо Висенте
Гильермо, Толон Мургия Бланка
Идельмис, Лопес Лопес Мигель
Антонио, Хунко Барранко Хесус
Артуро (CU)**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(56) EP-A2-1356822

Mayrel Labrada Mon: "Mecanismos inmunológicos asociados a la vacunación terapéutica de cáncer con NGcGM3/VSSP", 1 Enero 2015 (2015-01-01), XP055570763, Cuba, Retrieved from the Internet: URL: http://beduniv.reduniv.edu.cu/fetc_h.php?data=788&type=pdf&id=788&db=1 [retrieved on 2019-03-19] todo el documento, en particular, sections 3.5 and 3.6 on pagina 45

ZAIMA MAZORRA ET AL.: "Immunization with a GM3 ganglioside nanoparticulated vaccine confers an effector CD8+ T cells-mediated protection against melanoma B16 challenge", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 57, no. 12, 20 Marzo 2008 (2008-03-20), pagina 1771-1780, XP019654551, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-008-0503-8 todo el documento, en particular, paginal771

EP-A1-3028714

EP-A1-2335736

XU JINSHU ET AL.: "A synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine for control of fertility and hormone dependent diseases without any adjuvant", VACCINE, vol. 23, no. 40, 1 septiembre 2005 (2005-09-01), pagina 4834-4843, XP055570803, AMSTERDAM, NL ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.05.010, todo el documento, por ejemplo, resumen

US-A-6149921

LAURA MAURI ET AL.: "A procedure for the preparation of GM3 ganglioside from GM1-lactone", GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 16, 1 Enero 1999 (1999-01-01), pagina 197-203, XP055570304, todo el documento

(57) Настоящее изобретение описывает способы получения наночастиц адьювантов, образованных различными синтетическими вариантами ганглиозида GM3. В зависимости от микроструктуры жирной кислоты в керамиде синтетического GM3 указанные адьюванты способны специфическим и специализированным образом стимулировать гуморальный или клеточный иммунный ответ против сопутствующих антигенов. В частности, согласно настоящему изобретению предложены иммуногенные вакцинные композиции, содержащие пептиды, полипептиды или белки и вышеупомянутые наночастицы, которые образуются посредством дисперсии гидрофобных белков комплекса наружной мембраны (ОМС) *Neisseria meningitidis* в растворах, содержащих полностью синтетические варианты ганглиозида GM3.

Область техники

Настоящее изобретение относится к областям иммуно-нанотехнологии и иммуноонкологии, в частности к терапевтическим вакцинам для лечения людей, страдающих от рака и/или хронических инфекций, вызванных онкогенными вирусами. В частности, оно описывает наночастицы адъювантов, специализирующихся на специфической стимуляции клеточных или гуморальных иммунных эффекторов у этих пациентов, и обеспечивает соответствующие вакцинные композиции.

Уровень техники

После десятилетий неудачных результатов клинических испытаний терапевтические противораковые вакцины не смогли стать эффективным и малотоксичным средством лечения полезным для пациентов. Недавние клинические успехи, полученные с применением антител, ингибирующих контрольные точки иммунитета (АТ), стимулировали коммерческий и научный интерес к иммуноонкологии, включая противораковые вакцины. Неэффективность этих терапевтических вакцин могли быть вызваны такими факторами, как неправильный выбор антигенов, применение относительно неэффективных носителей/адъювантов и применение указанных вакцин в качестве монотерапии, то есть не в сочетании с другими иммуномодуляторами, которые позволяют корректировать негативный эффект, оказываемый микроокружением опухоли (Branca MA et al. (2016) *Nat Biotech* 34 (10): 1019-24).

Традиционно противораковые вакцины применяли в своих композициях белки, классифицированные как опухолевые аутоантигены, которые хоть и экспрессируются ошибочно в опухолевых клетках, также присутствуют в нормальных тканях. Отсутствие убедительных доказательств клинической эффективности этих вакцин может быть отчасти связано с процессом центральной толерантности, посредством которого происходит элиминация Т-клеток, имеющих рецепторы с высокой авидностью к большинству этих антигенов (Tran E. et. al (2017) *Nat Immunol* 18(3):255-62). Следовательно, эффективность противораковых вакцин на основе этого типа антигенов будет зависеть от применения новых специализированных адъювантов, способных усиливать специфический ответ эффекторных Т-клеток, который вначале относительно слабый, но впоследствии увеличивается таким образом, что опухоль становится источником природных неоантигенов. Это позволяет мобилизовать мощное мультиспецифичное и персонализированное действие цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных уничтожать злокачественные образования.

В последнее время уровень техники отражает изменение перспективы относительно выбора антигенов для эффективных противораковых вакцин с введением опухолевых неоантигенов. Привлекательным источником этих неоантигенов является персонализированное обнаружение индивидуальных опухолевых мутаций. Другим более ограниченным источником этого типа антигена являются последовательности вирусных онкогенных белков. Хотя эти мутировавшие пептиды обладают преимуществом за счет новизны для иммунной системы (они не присутствуют в нормальных тканях) и, следовательно, являются более иммуногенными, эффективность новых вакцин, разработанных с применением этих неоантигенов, также будет зависеть от способности новых адъювантов максимизировать ответы ЦТЛ, ищущих оптимальную доступность для антигена за счет локальной персистенции, что позволяет презентовать его антигенпрезентирующим клеткам (АПК) в контексте успешного созревания и дополнительно обойти иммуносупрессивный эффект микроокружения опухоли (МОО). С другой стороны, идентификация истинных неопептидов на практике является неэффективной процедурой. Исследования по секвенированию идентифицируют тысячи соматических мутаций в отдельных опухолях, а биоинформатические программы предсказывают сотни мутировавших пептидов, способных связываться с определенными МНС, но подавляющее большинство этих неопептидов не обнаруживалось в реальных опухолях, когда их изолировали и изучали методом масс-спектрометрии, и еще хуже, только немногие способны стимулировать ответ ЦТЛ. Это означает, что текущая методология прогнозирования и валидации неопептидов далеко не всегда применяется для введения персонализированной иммунотерапии в клиническую практику (Editorial (2017) *Nat Biotech* 35(2):97).

Для всех типов вакцин выбор подходящего адъюванта является решающим элементом для достижения желаемой эффективности. Основной целью терапевтической противораковой вакцины является стимулирование активации и пролиферации В-лимфоцитов, Т-клеток и медиаторов врожденного иммунитета таким образом, чтобы индуцированные гуморальные и клеточные иммунные эффекторы могли распознавать и уничтожать опухолевые клетки, тем самым повышая выживаемость и качество жизни пациентов. Для достижения этой цели идеальный адъювант должен в первую очередь оптимизировать доступность антигенов для АПК. Во-вторых, он должен эффективно стимулировать эти АПК, чтобы они вырабатывали необходимые ко-стимулирующие сигналы и выделяли специфические цитокины и хемокины. В-третьих, он должен быть способен модулировать МОО таким образом, чтобы нейтрализовать иммуносупрессирующие эффекты. В настоящее время адъювант со всеми этими характеристиками недоступен.

Как пояснил Khong H. с соавт. (Khong H. et al. (2016) *J. Immunother. Cancer* 4: 56), среди наиболее многообещающих вариантов адъювантов для противораковых вакцин в данной области техники представлены микро- и наночастицы, поскольку они могут проявлять несколько желаемых свойств в качестве усилителей вакцинации. Препараты из этих частиц могут быть сконструированы таким образом, чтобы посредством регулирования размера частиц, их жесткости и суммарной нагрузки позволить сопутст-

вующему антигену эффективно воздействовать на специфические АПК. Вакцины из частиц диаметром от 500 до 2000 нм преимущественно захватываются АПК в месте инъекции и перемещаются в лимфатические узлы (ЛУ), в то время как частицы от 20 до 200 нм пассивно стекают в ЛУ, где они захватываются резидентными АПК. Наиболее часто применяемыми микро- и наночастицами для этих целей являются липосомы, протеолипосомы, синтетические полимеры и природные полимеры. Преимущества и ограничения каждой из этих наночастиц подробно описаны в данной области техники.

Особенно подходящим для данного изобретения является описанный Xu F с соавт. (Xu F. et al. (2016) ACS Nano Vol. 10: 1189-1200) синтетический адъювант из наночастиц, содержащий в своем составе ганглиозид GM3. Этот адъювант был получен путем покрытия наночастиц золота диаметром от 40 до 80 нм липидной мембраной, в которую был вставлен ганглиозид GM3. Таким образом, можно выгодно рассмотреть принцип специфического взаимодействия гликолипид-рецептора, в частности, взаимодействие сиаиллактозы с Siglec1 (CD169), который сверхэкспрессируется в активированных дендритных клетках (ДК), протагонистах синапса с CD4+ Т-клетками в ЛУ. Хотя эти наночастицы, покрытые GM3, накапливаются избирательно *in vivo* в CD169+ ДК в подколенных ЛУ, из экспериментов по иммунизации со стандартизированными антигенами нет доказательств их потенциала в качестве адъюванта или их эффективности в опухолевых моделях. С другой стороны, этот принцип действует только в отношении наночастиц диаметром от 40 до 80 нм.

Molina с соавт. в патенте США № 7776346 описывают способы получения эффективных иммуногенов путем связывания протеолипосом очень малого размера (VSSP), образованных гидрофобной конъюгацией белкового комплекса внешней мембраны (OMPC) бактерии *Neisseria meningitidis* и ганглиозида GM3, с некоторыми слабо иммуногенными антигенами, что можно рассматривать как наиболее близкое к настоящему изобретению техническое решение. Кроме того, способ получения этих VSSP был подробно описан Rodríguez с соавт. в патенте США № 6149921, подчеркивающих, что ганглиозид GM3, применяемый для получения этих протеолипосом, должен быть получен из биологических источников, главным образом из массы гибридом, полученных в результате промышленного производства моноклональных АТ. Estévez и соавт. (Estévez et al. (2000) Vaccine Vol. 18: 90-197) показывают, что эти VSSP также могут быть получены с применением GM3, полученного из эритроцитов собак. В данной области техники известно, как объясняют Lee H. с соавт. (Lee H et al. (2011) Int J Mass Spectr Vol. 305: 138-150), что ганглиозид GM3, полученный из любого природного источника, состоит из варибельной смеси различных молекулярных частиц, где структура олигосахарида одинаковая, но структура церамида различается по составу жирных кислот. Помимо неудобства применения компонентов животного или опухолевого происхождения для производства фармацевтических препаратов, применение GM3 биологического происхождения в значительной степени препятствует получению VSSP с необходимыми высоко воспроизводимыми характеристиками.

Должно быть установлено, что прежде, чем быть описанным в настоящем изобретении, ни одно из предыдущих технических решений или научных публикаций не описывало варианты VSSP, полученные в процессе производства с применением различных полностью синтетических GM3 с химическими определенными структурами. Эти синтетические варианты также обладают удивительным свойством функционирования в качестве специализированных адъювантов для терапевтических вакцин в зависимости от молекулярной микроструктуры ганглиозида GM3, применяемого для их получения, и того, что эта специализация обеспечивает новые адъюванты с выгодными свойствами по сравнению с VSSP, полученными с GM3 из биологических источников. Следовательно, новизна данного изобретения заключается в создании новых наночастиц адъюванта VSSP, содержащих полностью синтетический ганглиозид GM3, в основном, но не ограничиваясь, структурами GM3 с церамидами, содержащими стеариновую кислоту, GM3 (18:0), главным образом для индукции сильных ответов антител против сопутствующих антигенов, или олеиновую кислоту, GM3 (18:1), в частности эффективную в индукции специфических эффекторных ответов ЦТЛ.

Краткое описание изобретения

В варианте осуществления настоящего изобретения мы описываем адъюванты, содержащие наночастицы, образованные путем ассоциации полностью синтетических вариантов ганглиозида GM3 с гидрофобными белками комплекса наружной мембраны бактерии *N. meningitidis*, в основном, но не ограничиваясь композициями, содержащими в церамиде ганглиозида GM3 стеариновую кислоту или олеиновую кислоту.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пептидным, полипептидным или белковым вакцинным композициям, содержащим вышеупомянутые наночастицы адъюванта и, необязательно, другой адъювант, который может быть, но не ограничен, квасцами или масляным адъювантом. В частности, антигены в этих вакцинных композициях представляют собой внеклеточные домены рецепторов факторов роста или их частей, таких как HER1, HER2 или HER3 по отдельности или в комбинации; или пептид PygGnRHm1-TT, связанный с гормоном GnRH. Указанные вакцинные композиции можно применять при получении лекарственного средства для лечения рака или хронических вирусных инфекций, вызванных онкогенными вирусами.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению вакцинных

композиций, содержащих наночастицы адъювантов, являющихся объектом настоящего изобретения, по отдельности, либо в комбинации для стимуляции антигенспецифичного гуморального или клеточного иммунного ответа пациента.

Кроме того, объектом настоящего изобретения является способ лечения для введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вакцинных композиций по настоящему изобретению подкожно (п/к), внутривенно, внутримышечно, интранодально, внутриопухолево или путем прямого нанесения на слизистые оболочки с двухнедельной частотой в течение по меньшей мере пяти полных индукционных доз и затем в ежемесячных поддерживающих дозах в течение по меньшей мере шести месяцев. Указанные композиции могут вводиться одновременно, с разнесением по времени или поочередно.

Подробное описание изобретения

Вакцинные композиции

Вакцинные композиции, применяемые в настоящем изобретении, образованы путем ассоциации наночастиц адъюванта, образованного путем дисперсии гидрофобных белков, полученных из OMPC N. meningitidis, в растворах полностью синтетических вариантов ганглиозида GM3 с пептидами, полипептидами или белками в качестве антигенов. В частности, указанные пептиды, полипептиды или белки могут представлять собой полные внеклеточные домены рецепторов факторов роста или их частей, а также могут быть связаны с гормонами, такими как GnRH, ассоциируемыми на определенных стадиях с опухолевой прогрессией, но не ограничиваясь указанными.

Тип жирной кислоты, присутствующей в керамиде ганглиозида GM3, включенной в один из VSSP настоящего изобретения, будет зависеть от цели вакцины; в случае, если желаемый эффект заключается в пользу ответа АТ, будет применяться стеариновая кислота (GM3 18:0), в то время как, если польза будет в отклике ЦТЛ, то будет применяться олеиновая кислота (GM3 18:1). Также возможно индуцировать у хозяина двойной ответ от АТ и ЦТЛ против одного и того же антигена путем адекватного сочетания иммунизации обоими вакцинными композициями. Как VSSP, содержащие GM3 (18:0), так и те, которые имеют GM3 (18:1), можно применять отдельно или в сочетании с другими адъювантами, такими как квасцовые или масляные композиции, но не ограничиваясь указанными.

Вакцинные композиции по настоящему изобретению, которые применяют VSSP с GM3 (18:0) в качестве адъюванта, по сравнению с вакцинными композициями с адъювантами из наночастиц, содержащими ганглиозид, полученный из природного источника, имеют превосходное качество по индуцированному гуморальному ответу, серологическому распознаванию опухолевых клеточных линий, серологическому ингибированию активации рецепторов в опухолевых клетках, а также по снижению жизнеспособности этих клеток.

Вакцинные композиции по настоящему изобретению, в которых применяются VSSP с GM3 (18:1) в качестве адъюванта, по сравнению с вакцинными композициями с адъювантами из наночастиц, содержащими ганглиозид, полученный из природного источника, индуцируют более мощный ответ ЦТЛ.

Терапевтическое применение и способы лечения

Согласно настоящему изобретению предложены вакцинные композиции, специализирующиеся на индукции ответов АТ или ЦТЛ против семейства рецепторов факторов роста, что является особенно полезным решением для этой антигенной системы, представляющей интерес для иммуноонкологии, поскольку известно, что как ответ АТ, так и специфические ответы ЦТЛ эффективны, но их трудно оптимизировать в одной вакцинной композиции и с одной схемой введения.

Также целью настоящего изобретения является внедрение вакцинных композиций, специализирующихся на получении высоких титров нейтрализующих АТ против гормонов, ассоциированных на определенных стадиях с прогрессированием опухоли, в частности, но не ограничиваясь, гормоном GnRH.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение терапевтических вакцинных композиций, способных генерировать мощные специфические ответы АТ или ЦТЛ, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом, страдающих от рака или хронических вирусных инфекций, вызванных онкогенными вирусами.

Вакцинные композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту: п/к, внутривенным, внутримышечным, интранодальным, внутриопухолевым путями или путем непосредственного нанесения на слизистые оболочки.

Среди типов рака, которые можно лечить с помощью вакцинных композиций, являющихся объектом настоящего изобретения, являются карциномы эпителиального происхождения. Более конкретно, примеры этих видов рака включают рак легких (мелкоклеточные и немелкоклеточные типы), гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак простаты, рак слюнных желез, рак почек, опухоли вульвы и щитовидной железы, рак анального канала и рак полового члена.

Диапазон доз внеклеточных доменов рецепторов факторов роста или их частей для применения на людях в вакцинных композициях по настоящему изобретению составляет от 200 мкг до 1 мг, предпочтительно в пределах от 400 до 900 мкг. Диапазон доз, который следует применять для пептида GnRH в вакцинных композициях по настоящему изобретению, составляет от 500 мкг до 3 мг, предпочтительно в

пределах от 1 до 2,5 мг. VSSP вводят в диапазоне от 100 мкг до 1 мг, предпочтительно от 200 до 600 мкг (в зависимости от содержания ОМРС).

Указанные композиции вводят субъектам с двухнедельной частотой в течение по меньшей мере пяти полных индукционных доз, и затем в ежемесячных поддерживающих дозах в течение по меньшей мере шести месяцев. Если желаемый эффект заключается в том, чтобы вызвать у хозяина двойной ответ АТ и ЦТЛ против одного и того же антигена, иммунизацию можно комбинировать с обеими вакцинными композициями одновременно, с разнесением по времени или поочередно.

Получение наночастиц адьюванта VSSP GM3 (18:0)

Сначала ОМРС N. meningitidis диспергируют в буферном растворе Tris-HCL, содержащем смесь дезоксихолата натрия (10-40 мМ) и додецилсульфата натрия (1-10 мМ), в реакторе и перемешивают в течение периода времени, варьирующемся от 1 до 36 ч. Затем добавляют массу синтетического ганглиозида (GM3 18:0) от 0,1 до 3 раз больше массы ОМРС и продолжают перемешивание. Впоследствии детергенты удаляют ультрафильтрацией или диализом. Ультрафильтрованный остаточный раствор концентрируют для доведения его концентрации до желаемой дозы, которая составляет от 0,1 до 1 мг/мл ОМРС, и стерилизуют фильтрацией в стерильной капсуле с размером пор 0,2 мкм.

Получение наночастиц адьюванта VSSP GM3 (18:1)

Сначала ОМРС N. meningitidis диспергируют в буферном растворе Tris-HCL, содержащем смесь дезоксихолата натрия (10-40 мМ) и додецилсульфата натрия (1-10 мМ), в реакторе и перемешивают в течение периода времени, варьирующемся от 1 до 36 ч. Затем добавляют массу синтетического ганглиозида (GM3 18:1) от 0,1 до 3 раз больше массы ОМРС и продолжают перемешивание. Впоследствии детергенты удаляют ультрафильтрацией или диализом. Ультрафильтрованный остаточный раствор концентрируют для доведения его концентрации до желаемой дозы, которая составляет от 0,1 до 1 мг/мл ОМРС, и стерилизуют фильтрацией в стерильной капсуле с размером пор 0,2 мкм.

Приготовление вакцинных композиций HER1, HER1+HER2 и HER3 с

VSSP GM3 (18:0) в качестве адьюванта

Предпочтительные вакцинные композиции по данному изобретению, которые содержат HER1 или HER1+HER2 или HER3 в качестве рецепторов факторов роста и VSSP GM3 (18:0) в качестве адьюванта для индукции мощного специфического гуморального иммунного ответа, получают следующим образом: содержимое отдельных флаконов с антигеном HER1 или HER1+HER2 или HER3 в растворе или лиофилизированном виде, а также раствор VSSP GM3 18:0, предварительно хранящийся при температуре от 4 до 20°C, смешивают отдельно в течение 10-30 мин рядом с кроватью пациента перед его инъекцией, чтобы конечное соотношение массы антигена и массы VSSP GM3 (18:0) (в соответствии с содержанием ОМРС) находилось в диапазоне от 300 мкг до 2 мг.

Приготовление вакцинных композиций HER1, HER1+HER2 и HER3 с

VSSP GM3 (18:1) в качестве адьюванта

Предпочтительные вакцинные композиции по данному изобретению, которые содержат HER1 или HER1+HER2 или HER3 в качестве рецепторов факторов роста и VSSP GM3 (18:1) в качестве адьюванта для индукции мощного специфического клеточного иммунного ответа, получают следующим образом: содержимое отдельных флаконов с антигеном HER1, HER1+HER2 или HER3 в растворе или лиофилизированном виде, а также раствор VSSP GM3 (18:1), предварительно хранящийся при температуре от 4 до 20°C, смешивают отдельно в течение 10-30 мин рядом с кроватью пациента перед его инъекцией, чтобы конечное соотношение массы антигена и массы VSSP GM3 (18:1) (в соответствии с содержанием ОМРС) находилось в диапазоне от 300 мкг до 2 мг.

Приготовление композиций пептидных вакцин GnRHm1-TT с

VSSP GM3 (18:0) в качестве адьюванта

Пептид GnRHm1-TT был получен путем замены в процессе биосинтеза аминокислоты L-глицин в шестой позиции, которую он обычно занимает в последовательности природного GnRH (EHWSYGLRPG), L-пролином (EHWSYPLRPG). Чтобы завершить его создание в процессе синтеза был добавлен эпитоп QYIKANSKFIGITEL анатоксина столбняка (Junco JA et al. (2007) Vaccine 25: 8460-68) посредством твердофазного метода (Houghten et al., (1986) Biotechniques 4.:522-6); пептид, полученный таким образом для цели настоящего изобретения, далее будет обозначаться как P_YGnRHm1-TT.

Предпочтительные вакцинные композиции по данному изобретению, которые содержат P_YGnRHm1-TT и VSSP GM3 (18:0) в качестве адьюванта для индукции мощного специфического гуморального иммунного ответа, могут быть приготовлены следующим образом: содержимое отдельных флаконов с антигеном P_YGnRHm1-TT в растворе или лиофилизированном виде и VSSP 18:0, предварительно хранящийся при температуре от 4 до 20°C, смешивают отдельно в течение 10-30 мин рядом с кроватью пациента перед его инъекцией таким образом, чтобы конечное соотношение массы антигена и массы VSSP GM3 (18:0) (в соответствии с содержанием ОМРС) находилось в диапазоне от 600 мкг до 4 мг.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Накопление клеток CD11b⁺GR1⁺ в селезенке мышей, несущих опухоль MCA203 и обработанных наночастицами VSSP, содержащими различные молекулярные частицы GM3, измеренные методом проточной цитометрии.

Фиг. 2. Измерение методом проточной цитометрии *in vivo* антиген-специфичного ответа ЦТЛ, индуцированного у мышей, иммунизированных OVA/VSSP GM3 (18:1), OVA/VSSP GM3 (18:0) и OVA/VSSP GM3 (природный источник).

Фиг. 3. Противоопухолевый эффект в модели EG7 при лечении вакцинами OVA с применением наночастиц VSSP в качестве адъювантов, содержащих различные молекулярные частицы GM3. График показывает индивидуальные значения объема опухоли в каждой группе и его среднее значение на 20-е сутки эксперимента. Пунктирная линия представляет значение, ниже которого опухоли были классифицированы как не прогрессирующие. Справа показана частота животных в каждой группе, у которых не было прогрессирования опухоли при лечении.

Фиг. 4. Титры IgG, индуцированные вакцинным препаратом HER3 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), по данным метода ELISA.

Фиг. 5а. Сравнение специфических титров АТ против HER1 и HER2, индуцированных препаратом двухвалентной вакцины HER1+HER2 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), с таковым, где адъювантом являлся VSSP GM3 (природный источник), по данным метода ELISA.

Фиг. 5б. Сравнение титров специфических АТ против субдоменов DEC-HER2, индуцированных препаратом двухвалентной вакцины HER1+HER2 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), с таковым, где адъювантом являлся VSSP GM3 (природный источник), по данным метода ELISA.

Фиг. 6. Сравнение распознавания опухолевых линий HER1+/HER2+ по АТ, индуцированных препаратом двухвалентной вакцины HER1+HER2 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), с таковым, где адъювантом являлся VSSP GM3 (природный источник), по данным метода проточной цитометрии.

Фиг. 7. Сравнение влияния на жизнеспособность опухолевой линии H125 HER1+/HER2+ АТ, индуцированных препаратом двухвалентной вакцины HER1+HER2 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), с таковым, где адъювантом являлся VSSP GM3 (природный источник), по данным колориметрического анализа МТТ.

Фиг. 8. Сравнение распознавания опухолевой линии MDA-MB468 (HER1+) по АТ, индуцированным препаратом вакцины HER1 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), с таковым, где адъювантом являлся VSSP GM3 (природный источник), по данным проточной цитометрии.

Фиг. 9. Сравнение ингибирования активации HER1 с помощью АТ, индуцированных препаратом вакцины HER1 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), либо VSSP GM3 (природный источник), по данным метода Western Blot.

Фиг. 10. Влияние иммунизации пептидом PyrGnRHm1-TT с и без VSSP GM3 (18:0) на вес простаты копенгагенской крысы.

Фиг. 11. Оценка скорости роста опухоли у копенгагенских крыс, которым имплантировали линию опухоли Dunning R3327-H.

Примеры

Пример 1. Введение VSSP GM3 (18:1) мышам, несущим опухоль MCA203, не увеличивает количество клеток CD11b⁺Gr1⁺ в селезенке.

Четыре группы самок мышей C57BL/6 (по 3 животных в группе) прививали п/к в день 0 по 1×10^6 клеток MCA203. Впоследствии на 11, 12 и 18 сутки вводили инъекции VSSP GM3 (природный источник), VSSP GM3 (18:1) и VSSP GM3 (18:0) (200 мкг ОМРС) п/к путем мышам из трех групп, четвертую группу мышей оставили в качестве необработанного контроля и ей вводили фосфатный буфер. На 22 сутки животных умерщвляли и экстрагированные селезенки анализировали индивидуально методом проточной цитометрии для определения количества клеток CD11b⁺Gr1⁺. Животные, обработанные VSSP GM3 (18:1) (фиг. 1), показали сходное количество этих регуляторных клеток по сравнению с мышами, несущими опухоль и получавшими только буфер. С другой стороны, количество клеток CD11b⁺Gr1⁺ значительно увеличилось в селезенках животных, которым вводили VSSP GM3 (природный источник) и VSSP GM3 (18:0) (равнозначные группы $p > 0,05$, различные группы $p < 0,05$, тесты ANOVA и Tukey).

Пример 2. Вакцинация OVA/VSSP GM3 (18:1) индуцирует в три раза более специфичную цитотоксичность CD8⁺ Т-клеток по сравнению с OVA/VSSP GM3 (природный источник) и OVA/VSS GM3 (18:0).

Антиген-специфичный ответ ЦТЛ *in vivo* сравнивали у самок мышей C57BL/6 (по 3 животных в группе), иммунизированных тремя различными композициями антигена OVA: одна с применением наночастиц VSSP GM3 (природный источник), другая с VSSP GM3 (18:1) и третья с применением VSSP GM3 (18:0) в качестве адъювантов. Вакцины вводили п/к на 0, 1 и 7 сутки (200 мкг ОМРС). Параллельно от по-разному меченных CFSE (5 мин при 37°C) наивных животных получали спленоциты. Клетки с высоким содержанием метки (5 мкМ) применяли в качестве клеток-мишеней после инкубации с пептидом SIINFEKL (1 мкМ, 90 мин при 37°C и 5% CO₂), тогда как клетки с низким содержанием метки (0,33 мкМ) без нагрузки пептидом применяли в качестве контроля. После последней иммунизации проводили промывку для удаления свободного пептида и оба типа спленоцитов смешивали в равных пропорциях и вводили вакцинированным животным. Через 16 ч паховые лимфатические узлы вакцинированных мышей удаляли и измеряли две интенсивности флуоресценции методом проточной цитометрии. Процент специфического лизиса рассчитывали по формуле: $100 - [(высокий\ CFSE / низкий\ CFSE) \times 100]$. Вакцина

OVA/VSSP GM3 (18:1) (фиг. 2) вызывала 60% специфического лизиса, что почти в три раза выше, чем у вакцины OVA/VSSP GM3 (природный источник) и у OVA/VSSP GM3 (18:0).

Пример 3. Применение наночастиц VSSP, содержащих GM3 (18:1) в качестве адъюванта, в терапевтических противораковых вакцинах улучшает их противоопухолевый эффект по сравнению с наночастицами, включая GM3, полученные из природных источников.

Три группы самок мышей C57BL/6 (по 10 животных в группе) прививали п/к в день 0 по 3×10^5 клеток опухоли EG.7 (вариант тимомы EL4, генетически модифицированной для экспрессии OVA в качестве неоантигена). Впоследствии на 4, 5 и 11 сутки проводили три последовательные иммунизации п/к путем с двумя различными вакцинными композициями OVA: первая (200 мкг/доза) с адъювантом VSSP GM3 (природный источник) и вторая с VSSP GM3 (18:1) (200 мкг/доза). Третьей группе мышей вводили фосфатный буфер по той же схеме и применяли в качестве контроля эксперимента. Через семь дней после прививания опухоли, объем опухоли (ОО) измеряли дважды в неделю. Животных умерщвляли, когда в опухоли обнаруживали некроз или, когда размер опухоли превышал 17 мм в диаметре. На 20-е сутки эксперимента (фиг. 3) наблюдали превосходство терапевтической вакцины OVA/VSSP GM3 (18:1) относительно композиции OVA/VSSP GM3 (природный источник) (ОО означает: VSSP GM3 (18:1) 560 мм³; природный 740 мм³; контроль 1640 мм³) ($p=0,037$, тесты ANOVA и Tukey). Наиболее важно обнаружение того, что в группе, получавшей препарат OVA/VSSP GM3 (18:1), у 50% животных не наблюдали прогрессирования опухоли, несмотря на то что EG7 является агрессивной моделью (в контрольной группе прогрессирование наблюдали у 100% животных). У животных, вакцинированных OVA/VSSP GM3 (природный источник), только у 20% не наблюдали прогрессирование ($p=0,012$, критерий хи-квадрат).

Пример 4. Индукция высоких титров специфичных для HER3 АТ вакцинным препаратом HER3/VSSP GM3 (18:0).

Мышей BALB/c ($n=5$) иммунизировали п/к вакцинным препаратом, содержащим 200 мкг ECD HER3, смешанного с 200 мкг VSSP GM3 (18:0). Иммунизации проводили на 0, 14, 28 и 42 сутки. Кровь забирали для получения сыворотки на 35-е сутки (1-й забор) и на 56-е сутки (2-й забор), и специфические титры АТ против ECD HER3 определяли методом ELISA. Платы покрывали 10 мкг/мл HER3 ECD и инкубировали при 37°C. После блокировки добавляли сывороточные разведения (1/100, 1/1000, 1/5000, 1/10000). Реакцию визуализировали с применением конъюгата анти-мышинных IgG АТ/пероксидазы (от Sigma) и соответствующего субстрата.

У иммунизированных мышей вырабатывались специфические IgG с титрами до 1/5000 (фиг. 4). Этот результат демонстрирует потенциал GM3 VSSP (18:0) к активации гуморального иммунного ответа против очень слабо иммуногенных антигенов, таких как аутологичные опухолевые антигены.

Пример 5. Сравнение индукции специфических IgG двухвалентной вакциной HER1+HER2 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), либо VSSP GM3 (природный источник).

Мышей BALB/c ($n=5$) иммунизировали вакцинными препаратами, содержащими смесь 100 мкг ECD HER1 и 100 мкг ECD HER2 с 200 мкг адъюванта VSSP GM3 (природный источник) (группа 1) или 200 мкг VSSP GM3 (18:0) (группа 2). Иммунизации проводили п/к на 0, 14 и 28 сутки. Кровь забирали и процессировали на 35 сутки. Специфичные титры АТ против HER1 и HER2 ECD определяли методом ELISA. Для этого платы покрывали 5 мкг/мл ECD HER1 или 5 мкг/мл ECD HER2 и инкубировали при 37°C. После блокировки добавляли сывороточные разведения (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/50000, 1/100000). Реакцию визуализировали с применением конъюгата анти-мышинных IgG АТ/щелочной фосфатазы и соответствующего субстрата. Преиммунную сыворотку применяли в качестве отрицательного контроля.

У всех иммунизированных мышей вырабатывались специфические IgG АТ. Титры АТ, специфичные для ECD HER1, были выше в группе 2, группе, в которой применялся адъювант VSSP GM3 (18:0), по сравнению с повышенными титрами АТ в группе 1, в которой применялся VSSP GM3 (природный источник) в качестве адъюванта (фиг. 5а). С другой стороны, даже если по части специфичных АТ, повышенных против ECD HER2, не было значительных различий между титрами АТ, индуцированных в группах 1 и 2, была тенденция к увеличению титров в группе 2, группе, в которой вакцинный препарат имел VSSP GM3 (18:0) в качестве адъюванта. Учитывая тенденцию, наблюдаемую при распознавании ECD HER2, проводили титрование против субдоменов EER HER2 (субдоменов I, II, III и IV, экспрессируемых на нитчатых фагах) очищенными поликлональными антителами (полиАТ), изолированными из иммунных сывороток. Для этого платы для ELISA покрывали 10 мкг мл полиАТ и инкубировали при 37°C. Затем добавляли образцы фагов, экспрессирующих различные субдомены HER2, и детектировали колориметрический сигнал с помощью антитела против фагов, конъюгированного с пероксидазой (от GE-Healthcare). Животные полиАТ, у которых в качестве адъюванта применяли GM3 VSSP (18:0), показали большую реактивность против субдоменов I, III и IV ECD HER2, чем очищенные антитела животных, на которых применяли VSSP GM3 (природный источник) (фиг. 5б).

Пример 6. Более высокое распознавание линий опухолевых клеток HER1+/HER2+ с помощью АТ, индуцированных двухвалентной вакциной HER1+HER2 с адъювантом VSSP GM3 (18:0), по сравнению с вакциной, применяющей VSSP GM3 (природный источник) в качестве адъюванта.

Мышей BALB/c ($n=5$) иммунизировали п/к вакцинными препаратами, содержащими смесь 100 мкг ECD HER1 и 100 мкг ECD HER2 с 200 мкг адъюванта VSSP GM3 (природный источник) или 200 мкг

адьюванта VSSP GM3 (18:0). Иммунизации проводили на 0, 14 и 28 сутки, и сыворотку, соответствовавшую 35-м суткам, применяли для оценки распознавания опухолевых клеточных линий, экспрессирующих HER1 и HER2 (эпителиальная карцинома вульвы A431 (ATCC-CRL 1555), немелкоклеточная карцинома легкого H125 (ATCC-CRC 5801) и карцинома молочной железы SKBR3 (ATCC-HTB 30)), методом проточной цитометрии. Для проведения измерения 10^5 клеток из каждой клеточной линии блокировали 2% фетальной телячьей сывороткой в забуференном фосфатом физиологическом растворе и затем инкубировали со смесью сывороток из каждой обработанной группы в разведении 1/200. Связывание специфических АТ с рецепторами HER1 и HER2 в опухолевых клетках визуализировали с применением конъюгата антимышиных IgG АТ/FITC (от Sigma) и путем получения по меньшей мере 5000 клеток в проточном цитометре. В качестве отрицательного контроля для каждой оцениваемой группы применяли смесь преиммунных сывороток. Сыворотки, индуцированные вакцинным препаратом с адьювантом VSSP GM3 (18:0), распознавали с большей интенсивностью оцениваемые линии опухолевых клеток (фиг. 6).

Пример 7. Двухвалентная вакцина HER1+HER2 с адьювантом GM3 VSSP (18:0) индуцирует антитела с повышенным влиянием на жизнеспособность линии опухолевых клеток H125 по сравнению с композицией, применяющей VSSP GM3 (природного происхождения).

Клетки H125 (10^5) инкубировали в течение 72 ч со смесями сывороток, полученными от мышей BALB/c, иммунизированных каждые 15 суток тремя дозами препарата двухвалентной вакцины, содержащей смесь 100 мкг ECD HER1 и 100 мкг ECD HER2 с адьювантом GM3 VSSP (18:0) или с VSSP GM3 (природного происхождения) в разведении 1/20. В качестве отрицательного контроля применяли смесь преиммунных сывороток в том же разведении, в то время как в качестве положительного контроля применяли 10 мкМ ингибитора тирозинкиназы AG1478. Определение влияния иммунной сыворотки на жизнеспособность клеток проводили, применяя колориметрический анализ МТТ и считывание поглощения проводили при 540 нм и 630 нм. Жизнеспособность клеток определяли по формуле:

$$\text{Клеточная жизнеспособность (\%)} = \frac{(A_{540\text{нм}} - A_{630\text{нм}}) \text{ иммунной сыворотки}}{(A_{540\text{нм}} - A_{630\text{нм}}) \text{ пре-иммунной сыворотки}} \times 100$$

Сыворотка, индуцированная вакциной с адьювантом GM3 VSSP (18:0), значительно снижала жизнеспособность клеток по сравнению с композицией, применяющей VSSP GM3 (природного происхождения) (фиг. 7).

Пример 8. Вакцина HER1 с адьювантом GM3 VSSP (18:0) индуцирует АТ с большей реактивностью против опухолевых клеточных линий HER1+ по сравнению с препаратом, применяющим VSSP GM3 (природного происхождения).

Мышей C57BL/6 (n=5) иммунизировали п/к вакцинными препаратами, содержащими 200 мкг ECD HER1 с 400 мкг адьюванта VSSP GM3 (природного происхождения) или с 400 мкг GM3 VSSP (18:0). Иммунизации проводили на 0, 14, 28 и 42 сутки, тогда как на 56 сутки у животных забирали кровь для оценки реактивности сывороток против интенсивного HER1, экспрессируемого в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB468 (ATCC-HTB 132), методом проточной цитометрии. В основном 10^5 клеток блокировали 2% фетальной телячьей сывороткой в забуференном фосфатом физиологическом растворе и затем инкубировали со смесью сывороток из каждой обработанной группы в разведении 1/100. Специфическое связывание АТ с рецепторами HER1 в опухолевых клетках визуализировали с помощью конъюгата антимышиных IgG АТ/FITC (от Sigma) и путем получения по меньшей мере 5000 клеток в проточном цитометре. В качестве отрицательного контроля для каждой оцениваемой группы применяли смесь преиммунных сывороток. Сыворотки, индуцированные вакциной с адьювантом VSSP GM3 (18:0), реагировали более интенсивно с опухолевыми клетками по сравнению с композицией, применяющей VSSP GM3 (природного происхождения) (фиг. 8).

Пример 9. Вакцина HER1 с адьювантом VSSP GM3 (18:0) индуцирует АТ с повышенной способностью ингибировать активацию HER1 по сравнению с композицией, применяющей VSSP GM3 (природного происхождения).

Четыре группы мышей C57BL/6 (n=5) иммунизировали п/к одним из следующих вакцинных препаратов:

- группа 1: 200 мкг HER1-ECD с 200 мкг адьюванта VSSP GM3 (природного происхождения);
- группа 2: 200 мкг HER1-ECD с 200 мкг адьюванта GM3 VSSP (18:0);
- группа 3: 200 мкг HER1-ECD с 400 мкг адьюванта VSSP GM3 (природного происхождения);
- группа 4: 200 мкг HER1-ECD с 400 мкг адьюванта GM3 VSSP (18:0).

Иммунизации проводили на 0, 14, 28, 42 сутки, и сыворотки, соответствующие 56 суткам, применяли для оценки способности сгенерированных АТ ингибировать фосфорилирование HER1 в присутствии EGF. Вкратце, клетки карциномы легкого H292 (CRL 1848) инкубировали в течение 2 ч со смесью сывороток в разведении 1/100. Впоследствии клетки стимулировали 100 нг/мл EGF в течение 10 мин, чтобы индуцировать активацию HER1. Влияние сыворотки на фосфорилирование HER1 измеряли методом Western-blot с применением специфических АТ для детектирования фосфорилированного HER1 и β -актина. Клетки, обработанные EGF, применяли в качестве контроля активации HER1. Смесь преиммунных сывороток в разведении 1/100 применяли в качестве отрицательного контроля ингибирования HER1,

а 10 мкМ ингибитора тирозинкиназы AG1478 применяли в качестве положительного контроля ингибирования. Фотографию эксперимента представили для денситометрического анализа для нормализации данных. Сыворотки, полученные от животных, иммунизированных вакцинами с применением GM3 VSSP (18:0) в качестве адъюванта, показали более сильное ингибирование активации рецептора HER1 по части фосфорилирования, чем сыворотки, полученные от групп мышей, которым вводили композицию с применением VSSP GM3 (природный источник) в дозах 200 и 400 мкг (фиг. 9). Этот результат демонстрирует превосходство вакцины, содержащей GM3 VSSP (18:0) в качестве адъюванта с точки зрения качества индуцированного гуморального иммунного ответа.

Пример 10. Влияние композиции вакцины PyrGnRHm1-TT/VSSP GM3 (18:0) на простату копенгагенских крыс.

Применяли самцов копенгагенских крыс в возрасте 8-12 недель. Животных разделяли на 3 группы по 10 животных в каждой:

- группа 1: вводили плацебо (Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 (18:0);
- группа 2: иммунизировали PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG;
- группа 3: иммунизировали PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 (18:0).

Для получения иммуногена пептид PyrGnRHm1-TT диспергировали в дистиллированной воде и наночастицах VSSP до достижения конечной концентрации 750 мкг пептида и 120 мкг VSSP в 250 мкл. Затем эту смесь пропорционально готовили в пропорции 50:50 (об./об.) с Montanide ISA 51 VG. Крысы получали 4 иммунизации с частотой в две недели.

Иммунизация пептидом PyrGnRHm1-TT, эмульсированным в Montanide ISA 51 VG, привела к значительному уменьшению размера простаты по сравнению с иммунизацией плацебо ($p < 0,05$). Это различие, однако, было намного больше, когда пептид PyrGnRHm1-TT эмульсировали в присутствии VSSP GM3 (18:0) ($p < 0,01$) (фиг. 10).

Пример 11. Индукция противоопухолевых ответов в модели R3327-H Dunning с применением пептида PyrGnRHm1-TT.

Взрослым копенгагенским крысам п/к трансплантировали в дистальную зону правой задней конечности (2×2×2 мм) опухолевые фрагменты модели мышинной опухоли Dunning R3327-H. Животных разделяли на четыре группы, получавших различное лечение:

- группа 1: плацебо: Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 (18:0);
- группа 2: кастрировали;
- группа 3: иммунизировали пептидом PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG;
- группа 4: иммунизировали пептидом PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 (18:0).

Иммунизации соответствующими вакцинами начинали, когда опухоли достигали диаметра приблизительно 10 мм. Всего было проведено 7 иммунизаций каждые 15 дней.

В то время как наблюдался выраженный рост опухоли в группе плацебо (группа 1) (фиг. 11), кастрированные и иммунизированные группы (группы 2, 3 и 4) показали заметное ингибирование роста опухоли ($p < 0,01$). Этот эффект был более значительным у крыс, иммунизированных пептидом PyrGnRHm1-TT, эмульсированным в присутствии VSSP GM3 (18:0) ($p = 0,005$).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Адъювант, который содержит наночастицы, образованные ассоциацией полностью синтетических вариантов ганглиозида GM3, с гидрофобными белками комплекса наружной мембраны бактерии *Neisseria meningitidis*.

2. Адъювант по п.1, в котором жирная кислота в керамиде ганглиозида GM3 представляет собой стеариновую кислоту (18:0).

3. Адъювант по п.1, в котором жирная кислота в керамиде ганглиозида GM3 представляет собой олеиновую кислоту (18:1).

4. Вакцинная композиция, которая содержит одну из наночастиц адъюванта по любому из пп.1-3 и пептиды, полипептиды или белки в качестве антигена.

5. Вакцинная композиция по п.4, которая опционально содержит другой адъювант, выбранный из группы, включающей

- квасцы и
- масляные адъюванты.

6. Вакцинная композиция по пп.4, 5, в которой антиген представляет собой внеклеточные домены рецепторов факторов роста или их части.

7. Вакцинная композиция по пп.4-6, в которой рецепторы факторов роста представляют собой HER1, HER2, HER3 по отдельности или в комбинации.

8. Вакцинная композиция по пп.4-6, где антиген представляет собой пептид GnRHm1-TT.

9. Вакцинная композиция по пп.4-8 для изготовления лекарства для лечения рака.

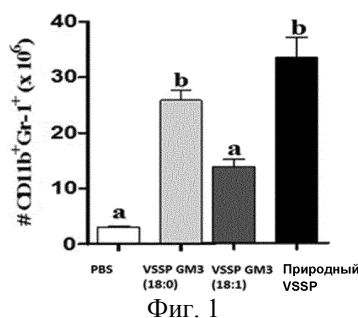
10. Вакцинная композиция по пп.4-8 для изготовления лекарства для лечения хронических вирусных инфекций, вызванных онкогенными вирусами.

11. Применение адъюванта по п.2 для стимуляции антиген-специфичного гуморального иммунного ответа.

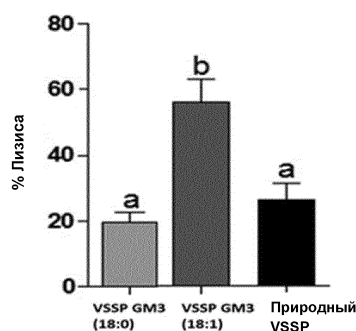
12. Применение адъюванта по п.3 для стимуляции антиген-специфичного клеточного иммунного ответа.

13. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение подкожным, внутримышечным, интранодальным, внутриопухолевым путями или путем непосредственного нанесения на слизистые оболочки вакцинных композиций по пп.4-8 каждые 15 дней в течение по меньшей мере пяти полных индукционных доз, а затем в ежемесячных поддерживающих дозах в течение не менее шести месяцев.

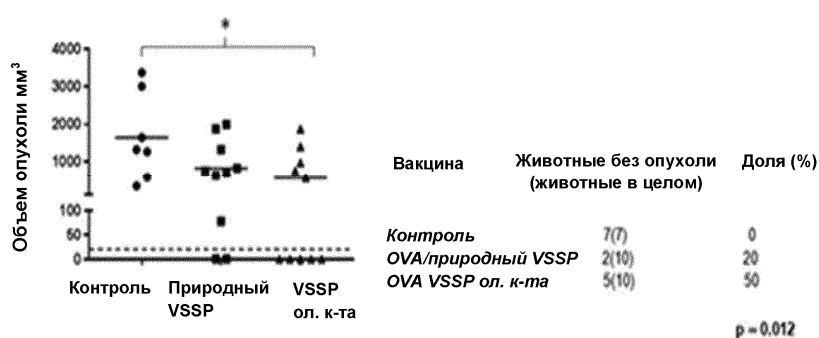
14. Способ по п.13, где вакцинные композиции вводят одновременно, с разнесением по времени или поочередно.



Фиг. 1

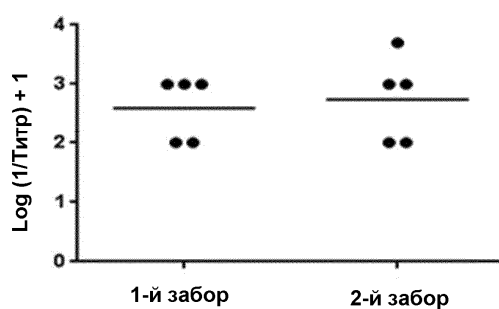


ФИГ. 2

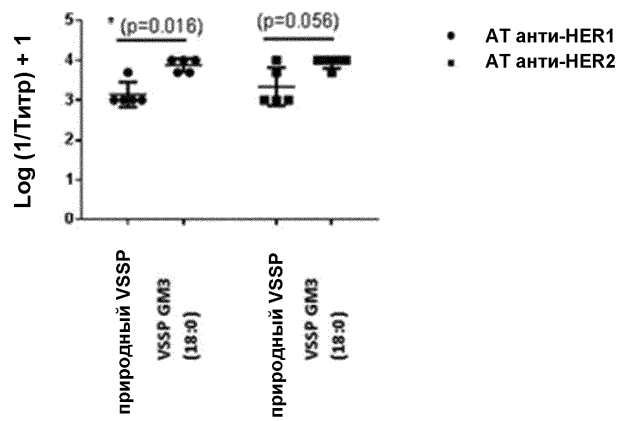


ФИГ. 3

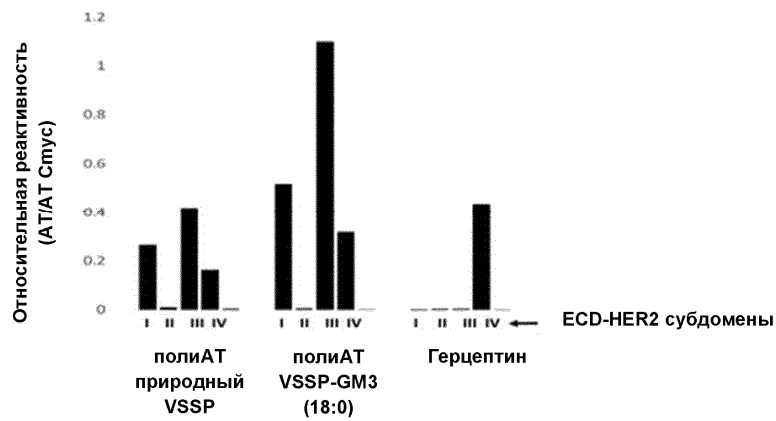
Титры антител для ECD-HER3



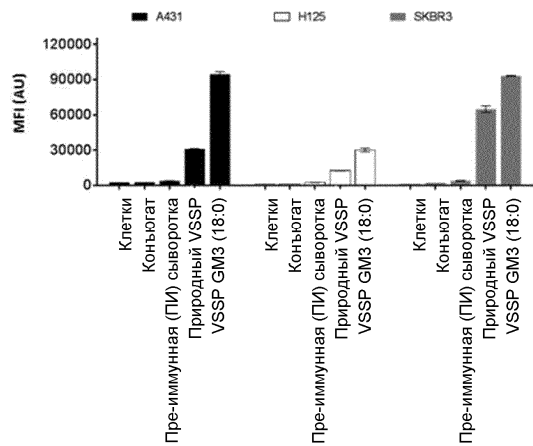
ФИГ. 4



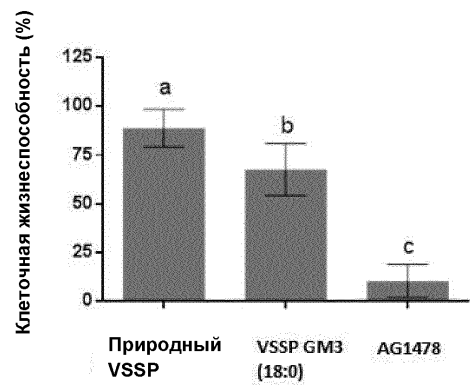
Фиг. 5a



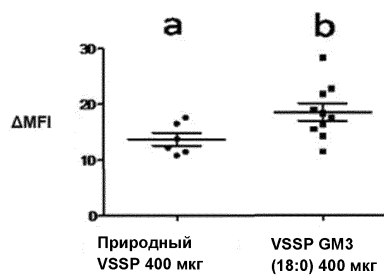
Фиг. 5б



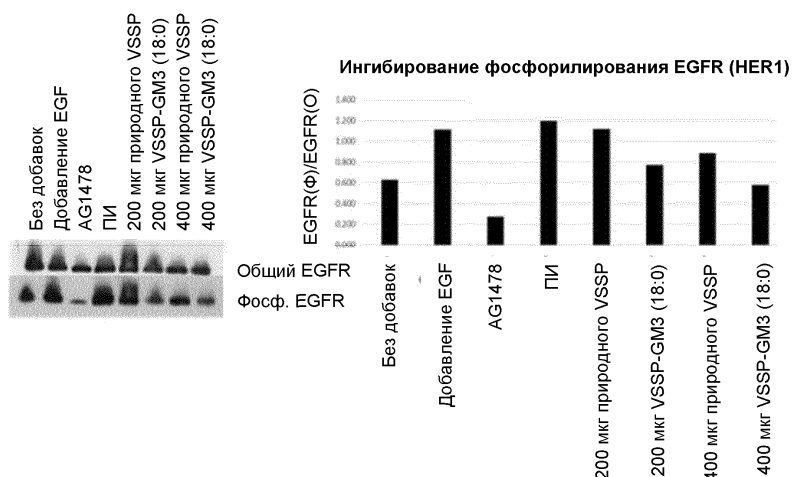
Фиг. 6



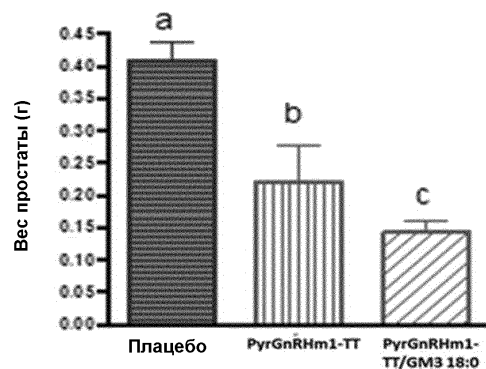
Фиг. 7



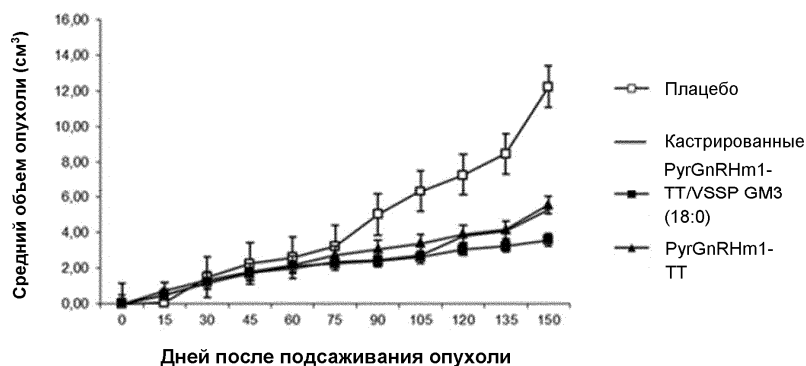
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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