

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293285** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.27

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

(22) Дата подачи заявки
2021.05.31

(54) КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА, ОСНОВАННЫЕ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ

(31) CU- 2020-0032

(32) 2020.06.09

(33) CU

(86) PCT/CU2021/050005

(87) WO 2021/259397 2021.12.30

(88) 2022.04.14

(71) Заявитель:

**ЦЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИЯ
МОЛЕКУЛАР; УНИВЕРСИДАД ДЕ
ЛА ГАВАНА (CU)**

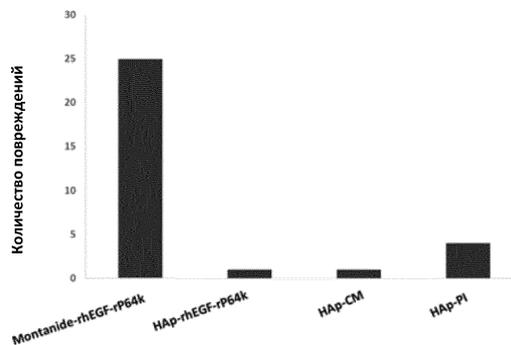
(72) Изобретатель:

**Гонсалес Руис Густаво, Гонсалес
Мартинес Дэвид Алехандро, Бордалло
Леон Фернандо, Санчес Рамирес
Белинда, Леон Монзон Калет,
Эчеверрия Луна Йеранди, Лусардо
Лоренцо Мария дель Кармен, Крус
Родригес Мейбел, Гонсалес Паломо
Адис, Санто Томас Помпа Хулио
Фелипе, Гарсия Арталехо Джудей
Аймед, Руис Кастро Элейн, Лопес
Матилла Лиен (CU)**

(74) Представитель:

Рыбина Н.А. (RU)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к области здоровья человека. В нем предложены новые композиции вакцин, содержащие в качестве активного начала систему, содержащую рекомбинантный EGF человека или его пептиды, и белок-носитель или пептид, связанный с ядром, которое состоит из неорганических наночастиц нанометрового или субмикронного размера. Эти композиции вакцин пригодны для длительного лечения рака и имеют преимущества, которые заключаются в том, что их введение не приводит к возникновению побочных эффектов в месте инъекции и что они не накапливаются в организме.



A1

202293285

202293285

A1

КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА, ОСНОВАННЫЕ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ

СФЕРА ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ

- 5 Настоящее изобретение относится к биотехнологии, в частности, к области здоровья человека. В частности, в нем описаны новые составы вакцин, содержащие системы наночастиц, которые вызывают иммунный ответ против эпидермального фактора роста и, следовательно, могут быть применены в качестве средства для лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- 10 Опухоли в тканях эпителиального происхождения обычно сверхэкспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (EGF – англ.: epidermal growth factor) на своей поверхности. Связывание аутологичного EGF с его рецептором (EGFR – англ.: epidermal growth factor receptor) активирует в опухоли механизмы, которые приводят к ее росту и уходу от защиты, которую обеспечивает иммунная система. Исходя из этой
15 информации, с 1990-х годов EGF был идентифицирован как терапевтическая мишень для лечения рака легкого и других видов рака эпителиального происхождения, для которых имеет релевантность связывание EGF с его рецептором.

- Было проведено множество исследований, направленных на оценку пассивной иммунотерапии антителами, нацеленными на EGFR. Ранее было продемонстрировано,
20 что специфическое распознавание рецептора антителами мышиноного происхождения ингибирует митогенную стимуляцию злокачественных клеток (Sato J.D. et al., Methods in Enzymology (1987) 146:63-81). В другом исследовании, опубликованном в патенте US 5,891,996, описаны патентованные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела, которые могут играть диагностическую или
25 терапевтическую роль в опухолях со сверхэкспрессией EGFR.

- В последние несколько лет применение активной иммунотерапии быстро распространяется по причине ее потенциала для борьбы с раком и его превращения в хроническое управляемое заболевание. В отличие от пассивных способов терапии, активная терапия основана на стимуляции иммунной системы для борьбы с опухолью
30 или другими элементами, которые способствуют ее развитию. Помимо других преимуществ, она снижает токсичность, поскольку требуемые дозы содержат лишь небольшие количества активных веществ.

Состав, упомянутый в патенте US 5,894,018, представляет собой композицию вакцины, которая вызывает иммунный ответ против аутологичного EGF. Упомянутый состав содержит аутологичный EGF, конъюгированный с белком-носителем (субъединицей В холерного токсина, столбнячным анатоксином, моноклональным антителом или белком наружной мембраны *Neisseria meningitidis*), и с добавленным в качестве адъюванта гидроксидом алюминия. С другой стороны, патент US 8,778,879 описывает композицию вакцины для терапевтического применения на пациентах с раком, которая имеет в качестве активного начала химический конъюгат рекомбинантного EGF человека (rhEGF – англ.: recombinant human epidermal growth factor) с рекомбинантным белком P64k. В этом документе описана процедура очистки химического конъюгата, повышающая его чистоту и иммуногенную активность. Эта композиция содержит адъювант, который может представлять собой гидроксид алюминия или монтанид (Montanide).

Более поздние клинические исследования показали, что терапевтическая вакцина, полученная на основе ранее упомянутых изобретений, безопасна и эффективна для лечения запущенной стадии немелкоклеточного рака легкого (NSCLC – англ.: Non-Small Cell Lung Cancer) (Rodríguez P.C. и соавт., *Clinical Cancer Research* (2016), 22 (15): 3782-3790). Однако было доказано, что пациенты, достигшие высоких показателей выживаемости (пять лет и более), страдают от повреждения мышц (дельтовидной и ягодичной) в местах инъекций в результате накопления минерального масла, содержащегося в указанном адъюванте. Это, в конечном итоге, приводит к необходимости прерывания лечения у некоторых пациентов или введения препарата в мышцы, более удаленные от лимфоидных органов.

Иммунологические адъюванты возникли из-за потребности в повышении иммуногенности вакцин, разработанных на основе рекомбинантных белков. Первым примененным адъювантом в 1926 году стал двойной сульфат алюминия. Впоследствии были квалифицированы различные неорганические адъюванты из алюминия, кальция, магния, железа, цинка, циркония, церия, бериллия и кремния. Однако для применения на человеке были одобрены только соли алюминия и кальция (Paneque-Quevedo A., *Applied Biotechnology* (2013) 30: 243-249). Во всех предшествующих проведенных исследованиях неорганические адъюванты применяли в сочетании с гетерологичными антигенами.

Гидроксид алюминия и адъюванты на основе фосфата алюминия не очень подходят для лечения хронических заболеваний, поскольку алюминий является токсичным и плохо метаболизируется в организме человека. Влияние накопления алюминия на здоровье человека задокументировано в полной мере, особенно на следующие системы: центральную нервную систему, опорно-двигательную систему, дыхательную, сердечно-сосудистую, эндокринную, мочевыделительную и репродуктивную системы (Nayak P., Environmental Research Section TO (2002), 89: 101-115; Verstraeten S. A. и соавт., Arch Toxicol (2008) 82: 789-802; Flaten T. P., Brain Research Bulletin (2001) 2: 187-196).

С другой стороны, фосфаты кальция (далее СаР) представляют собой неорганические вещества, которые, как было показано, могут быть применены в качестве иммунологических адъювантов. В патенте US 2,967,802 предложена смесь антигена рожи с гидратированным гелем СаР. В ходе исследований и последующего патентования были разработаны профилактические вакцины против инфекций, вызываемых несколькими патогенными и аллергенными микроорганизмами, адсорбируемыми в СаР (US 3,608,071, US 4016252; US 4350686; US 20120121714; Coursaget, P. и соавт., Infect Immun (1986) 51(3): 784-787).

Как и в случае с гидроксидом и фосфатом алюминия, иммунологический эффект адъювантов с СаР основан на формировании резерва медленно высвобождаемого антигена, что обеспечивает продолжительное время презентации для иммунной системы, достаточное для формирования ответа против привитого антигена. В патенте US 8,333,996 заявлена разработка иммуногенных систем, образованных путем адсорбции антигенов, таких как: *Bordetella pertusis*, аллергены, инактивированные вирусы иммунодефицита человека (HIV-2), гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH), вакцины против дифтерии, столбнячный анатоксин, стрептококки, ослабленные бактерии или вирусы, полиомиелита и гепатита А и В. Они также включают в себя адсорбцию ДНК и цитокинов, такие как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

В патенте US 6,355,271 заявлен способ получения частиц СаР диаметром от 300 до 4000 нм, основанный на водной смеси хлорида кальция, фосфата натрия и цитрата натрия для адсорбции вирусов простого герпеса (HSV-1, HSV-2) и вируса Эпштейна-Барра (EBV), ДНК, а также антигенов овальбумина и *Mycobacterium tuberculosis*.

В недавних исследованиях было оценено применение СаР в качестве адъюванта вакцины или для выпуска различных лекарственных средств. Среди них релевантными являются те, в которых проанализирована разработка дисперсных гидроксипатитовых систем $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, далее именуемых НАр), предпочтительно в форме наночастиц. Это вещество является основным неорганическим компонентом костной ткани, поэтому гарантирована его биологическая совместимость. Кроме того, аморфные или низкокристаллические НАр подвержены биоразложению при контакте с биологической средой. Уменьшение размера частиц и выбранный материал придают ему превосходные свойства в качестве адъюванта по сравнению с гидроксидом алюминия. Они вызывают более сбалансированный ответ Th1/Th2 и меньшее образование антител типа IgE (Qing, H. и соавт. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* (2000) 7(6): 899-903; Jones, S. и соавт., *Vaccine* (2014) 32: 4234-4242; Lin, Y. и соавт. *Expert Review of Vaccines* (2017), 16(9): 895-906. Кроме того, это вещество уменьшает побочные эффекты в месте инъекции, поскольку является биосовместимым, а в аморфной форме — биоразлагаемым.

В патенте WO 2005084637 заявлена система, содержащая: ядро из наночастицы СаР, биологически активную макромолекулу, инкапсулированную в частицу ядра, и агент модифицирования поверхности. Биологически активная макромолекула может представлять собой белок, полипептид, полисахарид, нуклеиновую кислоту, полинуклеотид, липид или углевод.

С другой стороны, в изобретении WO 2003051394 в едином составе представлены наночастицы НАр с различными типами покрытия для применения в качестве адъюванта. В нем наночастицы используются в качестве носителей нативных или рекомбинантных антигенов или других фармакологических агентов для применения на поверхности слизистых оболочек.

В других исследованиях заявлено о разработках и применении СаР в целом и, в частности, наночастиц НАр в качестве иммунологических адъювантов или носителей активных веществ для лечения инфекционных заболеваний или заболеваний иммунной системы, включая рак (US 5,443,832; US 6,355,271; US 6,767,550; US 20020068090; US 7,776,600; WO 2017025359).

Ни в одном из предыдущих документов не описаны композиции вакцины, которые вызывают специфический иммунный ответ против EGF или других аутологических

белков, сконструированных на поверхности частиц СаР, за счет их химического связывания с молекулами rhEGF и белком-носителем независимо друг от друга или путем их конъюгации.

Новизна данного изобретения заключается в создании новых композиций вакцин для
5 длительного лечения рака, образованных ядром из биоразлагаемых неорганических наночастиц, химически связанных с аутологичными антигенами. Посредством связывания частиц СаР, в частности НАр, нанометрового или субмикронного размера, с rhEGF или его пептидами и другим белком или пептидом-носителем, можно вызвать
10 иммунный ответ против EGF. Эти новые композиции превосходят существующие композиции, вызывающие ответ на EGF, тем, что они не сопровождаются побочными эффектами в месте инъекции и не накапливаются в организме. Кроме того, их дозируют в одном флаконе, поэтому во время применения не требуются дополнительные процедуры, такие как приготовление смесей или эмульсий.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композициям вакцины, которые вызывают иммунный ответ против EGF. Оно отличается тем, что
20 содержит в качестве активного начала систему, содержащую rhEGF или его пептиды и белок-носитель или пептид, связанные с ядром, которое образовано биоразлагаемыми неорганическими наночастицами, которые могут представлять собой соли, оксиды или гидроксиды кальция, железа, цинка, магния, циркония, церия, бериллия, кремния или смесь двух или более из них. Предпочтительно неорганическое ядро состоит из СаР, более конкретно — из типа НАр. Этот НАр предпочтительно является аморфным или низкокristаллическим и частично или
25 полностью покрыт органическим лигандом, в частности, цитратом натрия.

Кроме того, белок или пептидный носитель выбирают из группы, состоящей из: субъединицы В холерного токсина, столбнячного анатоксина, гемоцианина лимфы фисуреллы (KLH) и P64k *Neisseria meningitidis*.

Кроме того, активное начало композиций вакцины по настоящему изобретению
30 находится на поверхности наночастиц НАр, связанное одним из следующих способов:

- Ковалентная связь химического конъюгата rhEGF или его пептидов и белка-носителя или пептида с наночастицей НАр (НАр-rhEGF-rP64k).

– Ковалентная связь rhEGF или его пептидов и белка-носителя или пептида с наночастицей НАр независимым образом (НАр-PI).

– Последовательная ковалентная связь rhEGF или его пептидов и белка-носителя или пептида с наночастицей НАр.

5 – Множественная конъюгация между rhEGF или его пептидами и белком-носителем или пептидом на поверхности НАр (НАр-СМ).

– Инкапсуляция или физическая адсорбция rhEGF и белка-носителя или пептида на поверхности НАр.

10 В другом аспекте настоящего изобретения рассмотрена комбинация композиций вакцины, описанных в настоящем документе, с адъювантами, выбранными из групп, включающих в себя: неполные адъюванты Фрейнда, адъюванты на основе сквалена, адъюванты синтетического происхождения, адъюванты минерального происхождения, адъюванты растительного происхождения, адъюванты животного происхождения, адъюванты на основе белковых частиц и липосомы.

15 В дополнительном варианте осуществления задачей настоящего изобретения является применение описанных здесь композиций вакцины для длительного лечения рака.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа лечения субъекта, нуждающегося в этом, который включает в себя введение терапевтически эффективного количества описанных здесь композиций вакцины. Этот способ, в частности, отличается тем, что он поддерживает вызов иммунного ответа, достигнутого с помощью другой композиции вакцины против EGF.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 Настоящее изобретение включает в себя синтез биоразлагаемых неорганических наночастиц, покрытых органическими лигандами, их химическую активацию, а также их связывание посредством ковалентных связей или электростатических взаимодействий с антигеном, вызывающим специфический иммунный ответ против EGF, и их конструирование на поверхности этой частицы.

Получение и активация биоразлагаемых неорганических наночастиц

30 Настоящее изобретение включает в себя образование биоразлагаемых неорганических частиц нанометрового, субмикронного или микронного размера. Эти частицы покрыты органическим лигандом, предпочтительно цитратом натрия, и получены

путем осаждения, хотя этот способ не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения.

Биоразлагаемые частицы имеют неорганическое ядро, образованное солями, оксидами или гидроксидами кальция, железа, цинка, магния, циркония, церия, бериллия, кремния или смесью двух или более из них. Предпочтительно они образованы из CaP, более предпочтительно — из аморфного HAp или аморфного HAp с изоморфными замещениями одного или нескольких металлов.

Для образования указанных неорганических частиц используют источники кальция и ионов фосфата, а также органический лиганд, придающий им поверхностный заряд, и функциональную группу, позволяющую осуществлять химическую конъюгацию с биомолекулами.

Частицы, используемые в иммунотерапевтических системах, которые описаны в настоящем изобретении, отличаются тем, что они обладают по меньшей мере одним из следующих свойств:

- 15 - Они образованы биоразлагаемыми неорганическими частицами, которые могут иметь изоморфные замещения ионами металлов или другими ионами.
- Их получают предпочтительно влажным синтезом, более предпочтительно осаждением, хотя этот способ не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения.
- 20 - Они имеют микронные, субмикронные, нанометровые размеры или их комбинации.
- Они имеют сферическую, цилиндрическую или пластинчатую морфологию или их комбинации, хотя эти морфологии не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения.
- 25 - Они предпочтительно покрыты органическим лигандом, который придает им поверхностный заряд и функциональные группы, что делает возможным их конъюгацию с антигенами.

Для получения неорганических частиц, описанных в данном изобретении, предпочтительно требуется:

- 30 - Поддержание молярного соотношения катиона к аниону в пределах 1:4.
- Добавление к реагентам цитрата натрия или другого органического лиганда, обладающего аналогичным действием, в количестве, достаточном для обеспечения молярного соотношения между 3:5 и содержанием ионов кальция.

- Довести pH до 7-13 путем добавления щелочи, предпочтительно гидроксида аммония или гидроксида натрия.
 - Проводить реакцию в течение 1-4 ч, желателно при комнатной температуре ($20\pm 5^\circ\text{C}$).
- 5 - Выполнить процесс вакуумной сушки при комнатной температуре.

Неорганические частицы, полученные в описанных ранее условиях, частично или полностью покрытые органическим лигандом, который содержит карбоксилатные группы, предпочтительно цитрат натрия, активируют путем добавления сшивающего реагента из семейства карбодиимидов или другого семейства с аналогичными функциями. В этом процессе используют массовое соотношение реагент/частица от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 5 мг/мг. Указанную суспензию выдерживают с перемешиванием при комнатной температуре ($20\pm 5^\circ\text{C}$) в течение 1-4 ч, предпочтительно в течение 0,5-3 ч. Затем активированные частицы очищают, предпочтительно с помощью процессов центрифугирования или фильтрации.

15 С помощью описанной ранее процедуры получают частицы с преобладающим размером ≤ 200 нм и активированной поверхностью, обладающие способностью связываться с белками, имеющими открытые функциональные группы. Вышеупомянутые характеристики делают их превосходящими предшествующие разработки в сфере неорганических частиц для инкапсуляции или физической адсорбции активных компонентов.

Получение системы наночастиц для формирования ответа против EGF

Предварительно активированные частицы смешивают с химическим конъюгатом рекомбинантных белков rhEGF и rP64k при массовом соотношении rhEGF-rP64k/НАр 1-10, предпочтительно 2-7 мг/мг. Описанная ранее реакция приводит к ковалентной связи амидного типа между аминогруппами (NH_2) конъюгата и карбоксилатными группами (COO^-) на поверхности частицы. Электростатические взаимодействия также происходят между кальциевыми группами, оставшимися на поверхности НАр, и конъюгатом rhEGF-rP64k, который заряжен отрицательно и имеет открытые карбоксилатные группы. Затем коллоидную суспензию диспергируют, предпочтительно с помощью ЭДТА, и, наконец, ее pH доводят до значения от 6,7 до 7,3.

В другом варианте реализации химический конъюгат рекомбинантных белков rhEGF и rP64k заменен конъюгатом rP64k или другого белка-носителя с одним или несколькими пептидами rhEGF.

5 Связывание конъюгатов, описанных в настоящем изобретении, с поверхностью неорганических частиц происходит посредством указанной ранее процедуры. Результатом является новая система для лечения рака, первая в своем роде, которая имеет состав, существенно отличающийся от состава вакцин, описанных в патентах US 5,894,018 и US 8,778,879. Вакцинация этой системой вызывает иммунный ответ, который включает в себя выработку антител против EGF, способных захватывать

10 циркулирующий EGF и предотвращать его связывание с его рецептором на поверхности опухоли.

Система, полученная путем ковалентного связывания антигена с неорганическими частицами, является стабильной и может храниться в течение длительного периода времени, как это требуется для парентеральных препаратов. Этот признак делает ее

15 превосходящей иммунотерапевтические системы или системы доставки лекарств, разработанные ранее на основе неорганических частиц с помощью способов инкапсуляции или адсорбции активных веществ.

Формирование конъюгатов на неорганических частицах посредством ковалентных связей и электростатических взаимодействий для вызова ответа

20 **против EGF**

Настоящее изобретение содержит другие способы формирования систем для вызова иммунного ответа против EGF посредством ковалентных связей и электростатических взаимодействий между его компонентами, которые подробно описаны ниже:

- *Связывание rhEGF или его пептидов и белка-носителя или его пептидов с*
- 25 *неорганическими наночастицами.*

Частицы, полученные по ранее описанным методикам, предварительно активированные с помощью карбодиимида, предпочтительно 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC), смешивают со стерильным раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7 ± 0 , содержащего rhEGF и rP64k при молярном

30 соотношении rhEGF/rP64k от 3 до 9, предпочтительно от 4 до 8. Кроме того, применяемые массовые соотношения NAr/rP64k и NAr/rhEGF составляют от 1 до 6,

предпочтительно от 2 до 5 мг/мг. Затем суспензию перемешивают при комнатной температуре в течение 1–4 часов, более предпочтительно, в течение 2–3 часов.

В дополнительных вариантах реализации рекомбинантный белок rP64k замещен белком-носителем, таким как столбнячный анатоксин, гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH) или другим. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k одним или несколькими иммуногенными пептидами природного или синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

Используя описанный выше способ, получают систему, в которой белки rhEGF и rP64k связаны с наночастицами химически и посредством электростатических взаимодействий, но не связаны друг с другом. Неорганическая частица представляет собой структурный элемент для связывания, который обеспечивает иммуногенность системы. Кроме того, он снижает до 40% количество rhEGF, необходимого для образования указанной системы, и снижает риски, связанные с токсичностью глутарового альдегида, применяемого по изобретениям US 5,894,018 и US 8,778,879.

- *Конъюгация rhEGF или его пептидов и белка-носителя или его пептидов с помощью двух этапов реакции.*

Наночастицы, полученные с помощью ранее описанных методик, предварительно активированные карбодиимидом, предпочтительно EDC, смешивают с раствором PBS, pH 7±0,3, содержащим rP64k в массовом отношении 1–6, предпочтительно между 2–5. Суспензию перемешивают при комнатной температуре в течение 1–4 часов, предпочтительно в течение 2–3 часов. Затем удаляют избыток белка rP64k, активируют ее предпочтительно с помощью EDC, затем удаляют избыток EDC и смешивают с rhEGF при молярном соотношении rhEGF и rP64k 1–10, предпочтительно 2–6.

В дополнительных вариантах реализации рекомбинантный белок rP64k заменяют столбнячным анатоксином, гемоцианином лимфы фисуреллы (KLH) или другим белком-носителем. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k одним или несколькими иммуногенными пептидами естественного или синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

Эта процедура создает систему, в которой белок-носитель химически или с помощью электростатических взаимодействий связан с биоразлагаемыми неорганическими наночастицами, а также с rhEGF. Этим способом получают конъюгат rhEGF-rP64k, образованный двумя слоями белков высокой чистоты, без свободного rhEGF или rP64k. Этот конъюгат превосходит конъюгат rhEGF-rP64k по изобретениям US 5,894,018 и US 8,778,879, в которых более 40% полученного rhEGF находится в свободной форме, которая не имеет никакого биологического значения. Кроме того, это снижает риски, связанные с токсичностью глутарового альдегида, применяемого в двух упомянутых выше изобретениях.

- 10 - *Множественная конъюгация rhEGF или его пептидов и белка-носителя или его пептидов на поверхности неорганической частицы.*

Частицы, полученные с помощью ранее описанных методик, предварительно активированные с помощью карбодиимида, предпочтительно EDC, смешивают с раствором PBS, pH 7±0,3, содержащим rhEGF и rP64k. Оба белка реагируют с активированными частицами и с избытком EDC, который остается в растворенном состоянии после активации, связывая белки друг с другом и с поверхностью частицы. Для получения этого результата следует применять молярное соотношение rhEGF/rP64k, равное 3–9, предпочтительно 4–8. Кроме того, массовые соотношения частица/rP64k и частица/rhEGF должны составлять от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 5. Их перемешивают при комнатной температуре в течение 1–4 часов, более предпочтительно в течение 2–3 часов.

В дополнительных вариантах реализации рекомбинантный белок rP64k заменяют столбнячным анатоксином, гемоцианином лимфы фисуреллы (KLH) или другим белком-носителем. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k одним или несколькими иммуногенными пептидами естественного или синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

Формируется сложная матрица конъюгатов rhEGF-rP64k, и эти белки связываются с лигандом, который покрывает неорганическую наночастицу. Аналогично предыдущим реализациям, эта система вызывает иммунный ответ антител против EGF. Также она снижает до 40% количество rhEGF, необходимого для образования

указанной системы, и снижает риски, связанные с токсичностью глутарового альдегида, применяемого по изобретениям US 5,894,018 и US 8,778,879.

Формирование систем для вызова ответа против EGF путем инкапсуляции или адсорбции на неорганической частице

5 Хотя химически связанные системы, полученные с помощью описанных ранее процедур, являются более стабильными и подходят для составов вакцин, инкапсуляция и адсорбция антигена также являются полезными процедурами. По этой причине настоящее изобретение обеспечивает способы синтеза иммуногенов, которые имеют неорганическое ядро и конъюгат rhEGF-rP64k или rhEGF и rP64k или их
10 пептиды внутри частицы или адсорбированы на ее поверхности.

- *Инкапсуляция конъюгата rhEGF и белка-носителя или его пептидов в неорганическую частицу:*

Источники, несущие ионы кальция и фосфата, смешивают в водном растворе, обеспечивая поддержание соответствующего молярного соотношения катиона к
15 аниону в пределах 1,4–3,5. Конъюгат rhEGF-rP64k добавляют при массовом соотношении rhEGF-rP64k/неорганическая наночастица в пределах 1–10, более предпочтительно 2–7. Затем добавляют гидроксид аммония или гидроксид натрия до тех пор, пока не будет получен показатель pH 8-10, и реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре с перемешиванием в течение 1–4 ч. После
20 завершения реакции смесь предпочтительно промывают очищенной водой и отделяют фильтрованием. Эта процедура формирует наночастицы и микрочастицы, которые содержат конъюгаты rhEGF-rP64k внутри и на поверхности, связанные взаимодействиями между положительно заряженными группами частицы и карбоксилатными группами конъюгата и между отрицательно заряженными группами
25 частицы и аминоклуппами конъюгата.

В дополнительном варианте реализации рекомбинантный белок rP64k заменяют столбнячным анатоксином, гемоцианином лимфы фисуреллы (KLH) или другим белком-носителем. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k
30 одним или несколькими иммуногенными пептидами естественного или синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

- *Инкапсуляция rhEGF или его пептидов и белка-носителя или его пептидов в неорганической частице:*

Эта процедура аналогична описанной ранее, и отличается только тем, что к раствору вместо конъюгата rhEGF-rP64k добавляют rhEGF и rP64k в массовом соотношении 1–
5 10, еще более предпочтительно 2–7. Во время этого процесса поддерживают молярное соотношение rhEGF и rP64k 1–10, более предпочтительно соотношение rhEGF и rP64k 2–5. После завершения реакции смесь предпочтительно промывают очищенной водой и отделяют фильтрованием. Эта процедура формирует наночастицы и микрочастицы, которые содержат конъюгаты rhEGF-rP64k внутри и на поверхности, связанные
10 электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными группами частицы и карбоксилатными группами конъюгата и между отрицательно заряженными группами частицы и аминок группами конъюгата.

В другом дополнительном варианте реализации рекомбинантный белок rP64k заменяют столбнячным анатоксином, гемоцианином лимфы фисуреллы (KLH) или
15 другим белком-носителем. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k одним или несколькими иммуногенными пептидами естественного или синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

- 20 - *Адсорбция конъюгата rhEGF и белка-носителя или его пептидов на неорганической частице:*

Описанные ранее частицы, покрытые цитратом натрия, смешивают с раствором PBS, имеющим рН $7 \pm 0,3$, который содержит конъюгат rhEGF-rP64k в массовом соотношении 1–10, еще более предпочтительно 2–7. Их перемешивают при комнатной
25 температуре в течение 1–4 часов, более предпочтительно 2–3 часов. Система, полученная в результате этой процедуры, состоит преимущественно из наночастиц с размерами менее 200 нм. Конъюгат rhEGF-rP64k связан электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными группами на поверхности наночастицы и карбоксилатными группами конъюгата, а также между
30 карбоксилатными группами цитрата и аминок группами конъюгата.

В других вариантах реализации рекомбинантный белок rP64k заменяют столбнячным анатоксином, гемоцианином лимфы фисуреллы (KLH) или другим белком-носителем. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k одним или

несколькими иммуногенными пептидами естественного или синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

- 5 - *Адсорбция rhEGF или его пептидов и белка-носителя или его пептидов на неорганической частице:*

Эта процедура аналогична описанной ранее в предыдущем варианте реализации, и отличается только тем, что к раствору вместо конъюгата rhEGF-rP64k добавляют rhEGF и rP64k в массовом соотношении 1–10, еще более предпочтительно 2–7. Для
10 этого процесса требуется поддерживать молярное соотношение rhEGF и rP64k 1–10, более предпочтительно молярное соотношение rhEGF и rP64k 2–5. Эта процедура формирует наночастицы и микрочастицы, которые содержат на поверхности молекулы rhEGF и rP64k, связанные взаимодействиями между положительно заряженными группами частицы и карбоксилатными группами белков и между
15 отрицательно заряженными группами частицы и аминоклуппами белков.

В дополнительных вариантах реализации рекомбинантный белок rP64k заменяют столбнячным анатоксином, гемоцианином лимфы фисуреллы (KLN) или другим белком-носителем. Настоящее изобретение также включает в себя замену белка rP64k одним или несколькими иммуногенными пептидами естественного или
20 синтетического происхождения.

В дополнительных вариантах реализации rhEGF замещен одним или несколькими его пептидами.

Ранее описанные новые системы частиц формируются на биоразлагаемом неорганическом ядре. Это ядро связано с аутологичными антигенами,
25 предпочтительно химическими конъюгатами рекомбинантных белков rhEGF и rP64k, или индивидуально связано с упомянутыми белками или их пептидами. Эти системы поддерживаются ковалентными связями амидного типа, инкапсуляцией или адсорбцией на поверхности наночастицы. Они составляют основу составов вакцин для лечения рака, вводимых парентеральным способом после диспергирования с
30 ЭДТА и регулирования рН до уровня $7 \pm 0,3$.

Фармацевтические композиции и способы лечения

Фармацевтические составы, полученные в соответствии с настоящим изобретением, применимы для лечения рака эпителиально-тканевого происхождения. Например: рак клеток плоского эпителия, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома легкого, печеночноклеточный рак, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак головки, шейки и матки, глиобластома, рак слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома анального канала и карцинома полового члена.

Они могут быть применены отдельно или в сочетании с адъювантами, которые усиливают или дополняют формируемый ими ответ против антител EGF.

В частности, задачей настоящего изобретения является комбинация систем биоразлагаемых неорганических наночастиц, связанных с белками rhEGF-rP64k, с маслянистыми адъювантами, такими как неполные адъюванты Фрейнда, адъюванты на основе сквалена, синтетические, минеральные, растительные адъюванты или адъюванты животного происхождения. Также сюда входят адъюванты с белковыми частицами и липосомами или другие адъюванты или системы, способные вызывать или усиливать гуморальные или клеточно-опосредованные иммунные ответы, или их комбинацию. Описанные выше системы эффективно поддерживают предшествующую стимуляцию иммунного ответа против антител EGF, вызываемого составом, который описан в патенте US 8,778,879, или другой системой, дающей аналогичные результаты.

Комбинации, описанные ранее, благоприятствуют длительному лечению рака эпителиально-тканевого происхождения, поскольку лечение с их помощью позволяет избежать накопления инородных веществ в организме в местах инъекций и, следовательно, не приводит к токсичности, связанной с введением.

В системах против-EGF, содержащихся в настоящем изобретении, применяются фармацевтически приемлемые наполнители. Эти наполнители включают в себя, но не ограничиваются ими: воду для инъекций, хлорид натрия, соли фосфора и калия, хлорид кальция, цитрат натрия, гидроксид натрия и ЭДТА. Они могут быть введены пациентам с раком эпителиального происхождения в виде парентеральных препаратов с концентрацией белка от 0,5 до 5 мг/мл и в диапазоне доз 20–70 мкл/кг или 20-70 мкг

общего белка на килограмм или до 5 мг общего белка, более предпочтительно 30–60 мг/кг. Доза неорганического компонента, ограниченная для введения по настоящему изобретению, должна составлять от 2 до 4,5 мг/кг, предпочтительно от 3 до 4 мг/кг, при условии, что она находится в пределах утвержденного диапазона доз для введения человеку внутримышечно или подкожно.

Настоящее изобретение дополнительно разъяснено с помощью следующих примеров и графических материалов. Однако эти примеры не следует рассматривать, как ограничивающие объем настоящего изобретения.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Дифракционная рентгенограмма А) Частицы аморфного НАр, полученные по настоящему изобретению. В) Стандартная дифрактограмма НАр – JCPDS (Объединённый комитет по химическому анализу с использованием порошковых дифракционных методов при Национальном Бюро стандартов США): PDF Ref. 09-0432.

Фиг. 2. Спектр инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье (FTIR) А) Частицы аморфного НАр, полученные по настоящему изобретению. В) Цитрат натрия.

Фиг. 3. Размер частиц аморфного НАр, полученных по настоящему изобретению, определяют с помощью электронной просвечивающей микроскопии. А) Изображение частиц, записанное при увеличении в 25 000 раз. В) Изображение частиц, записанное при увеличении в 500 000 раз. С) Распределение размеров частиц.

Фиг. 4. Термограмма наночастиц аморфного НАр, полученных по настоящему изобретению.

Фиг. 5. Распределение размеров ковалентно связанной системы НАр-rhEGF-rP64k, определенное способом динамического рассеяния света (DLS).

Фиг. 6. Характеристика системы НАр-rhEGF-rP64k с помощью: А) электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE): 1 – Диаграмма молекулярной массы 2 – Положительный контроль конъюгата rhEGF-rP64k, подробно описанного в изобретении US 8,778,879, 3 – система НАр-rhEGF-rP64k. В) Профиль вестерн-блоттинга: 1 – Положительный контроль конъюгата rhEGF-rP64k, 2 – система НАр-rhEGF-rP64k.

Фиг. 7. Ответ на антитело к EGF мышей C57BL/6, иммунизированных с помощью ковалентно связанной системы НАр-rhEGF-rP64k и контрольной группы (Montanide-rhEGF-rP64k).

5 **Фиг. 8.** Соотношение антител подклассов (IgG2b + IgG2c)/IgG1, содержащихся в сыворотке мышей C57BL/6, иммунизированных системами НАр-rhEGF-rP64k и контрольной группы (Montanide-rhEGF-rP64k).

Фиг. 9. Фотография эффектов от систем НАр-rhEGF-rP64k и Montanide-rhEGF-rP64k в месте инъекции у мышей BALB/c. А) Эффект системы Montanide-rhEGF-rP64k. В) Эффект системы НАр-rhEGF-rP64k.

10 **Фиг. 10.** Ответ на антитело к EGF мышей C57BL/6, иммунизированных с помощью системы НАр-rhEGF-rP64k в комбинации с протеолипосомой малого размера (VSSP) и с rhEGF-rP64k, инкапсулированной в липосомах.

Фиг. 11. Соотношение антител подклассов (IgG2b + IgG2c)/IgG1, содержащихся в сыворотке мышей C57BL/6, иммунизированных с помощью системы НАр-rhEGF-rP64k в комбинации с протеолипосомой малого размера (VSSP) и с rhEGF-rP64k, инкапсулированной в липосомах.

15 **Фиг. 12.** Поддержание ответа на антитело к EGF системы НАр-rhEGF-rP64k с предшествующей стимуляцией иммунного ответа, вызванного одной или двумя дозами системы Montanide-rhEGF-rP64k.

20 **Фиг. 13.** Распределение размеров системы НАр-PI, сформированной на частице, определенное с помощью способа динамического рассеяния света (DLS).

Фиг. 14. Характеристика системы НАр-PI с помощью: А) электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE): 1 – Диаграмма молекулярной массы 2 – Положительный контроль rP64k, 3 – Положительный контроль rhEGF, 4 – система НАр-PI и В) Профиль вестерн-блоттинга: 1 – Положительный контроль rP64k, 2 – система НАр-PI.

Фиг. 15. Распределение размеров системы НАр-СМ, определенное с помощью способа динамического рассеяния света (DLS).

30 **Фиг. 16.** Характеристика системы НАр-СМ с помощью: А) электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE): 1 – Диаграмма молекулярной массы, 2 – Положительный контроль конъюгата rhEGF-rP64k, подробно описанного в изобретении US 8,778,879, 3 – система НАр-СМ и В) Профиль вестерн-блоттинга 1 – Положительный контроль конъюгата rhEGF-rP64k, 2 – система НАр-СМ.

Фиг. 17. Ответ на антитело к EGF мышей C57BL/6, иммунизированных с помощью систем НАр-rhEGF-rP64k, НАр-PI и НАр-СМ.

Фиг. 18. Соотношение антител подклассов (IgG2b + IgG2c)/IgG1, содержащихся в сыворотке мышей C57BL/6, иммунизированных системами НАр-rhEGF-rP64k, НАр-PI и НАр-СМ, и контроля Montanide-rhEGF-rP64k.

Фиг. 19. Фотографические изображения гистологических срезов мышечной ткани, извлеченных из места вакцинации, и прилегающей мышечной ткани мышей C57BL/6, при 10-кратном увеличении. ★ Изображения фибробластной восстановительной ткани. Мыши были обработаны с помощью: А-С: Montanide-rhEGF-rP64k, D: НАр-rhEGF-rP64k, E: НАр-СМ, F: НАр-PI.

Фиг. 20. Количество поражений, наблюдаемых в тканях в местах инъекции у мышей C57BL/6, иммунизированных системами НАр-rhEGF-rP64k, НАр-PI и НАр-СМ, и контроля Montanide-rhEGF-rP64k.

ПРИМЕРЫ

Пример №1. Синтез, характеристика и активация наночастиц НАр

Следуя модифицированному варианту процедуры, описанной М. Королевой и соавт., Журнал неорганической химии (2016), 61(6): 674-680), были получены наночастицы аморфного НАр, покрытые цитратом натрия. Раствор готовили в контролируемых условиях окружающей среды из CaCl_2 0,05 моль/л и цитрата натрия при молярном соотношении цитрат натрия/кальций в 4:1 (раствор А). Затем добавляли стерильный раствор В, образованный из NaN_2PO_4 0,06 моль/л с расходом в 1 мл/мин, поддерживая молярное соотношение Са/Р на уровне 1,67. Затем рН реакции доводили до показателя 10 путем растворения гидроксида натрия и в течение трех часов продолжали перемешивание при комнатной температуре. После завершения реакции ее продукт промывали очищенной водой и отделяли фильтрованием с применением полиэфирсульфоновой мембраны Amicon на 10 кДа. Полученное твердое вещество сушили в вакууме при комнатной температуре. Далее в течение 30 минут выполняли стерилизацию с помощью чистого пара с температурой 120°C и сушили в вакууме.

С помощью рентгеновского дифракционного анализа было продемонстрировано, что образуются аморфные наночастицы НАр со степенью кристалличности 9,3% и размером кристаллитов 16,5 нм (Фиг. 1). В этом анализе использовали медное

излучение (Cu K α) в трубке, работающей при 45 кВ и 40 мА. Диапазон составлял от 10° до 90° с шагом 0,013° и интервалом в девять секунд.

Спектр инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье (FTIR) наночастиц (А) и цитрата натрия (В), применяемого в качестве контроля, показаны на Фиг. 2. Полосы, наблюдаемые в спектре наночастиц при 1090, 1030, 962, 604, 561 и 472 см⁻¹, подтверждают наличие фосфатных групп, соответствующих НАр. Также при 3400 см⁻¹ наблюдалась широкая полоса, присущая остаточной воде и группам ОН⁻. Полосы карбоксилатных групп цитрата также наблюдались в обоих спектрах при 1610 и 1413 см⁻¹, что подтверждает присутствие этого лиганда на поверхности.

10 Наночастицы, определенные с помощью электронной просвечивающей микроскопии, имели сферическую морфологию (Фиг. 3А и 3В) при среднем размере 62±13 нм (Фиг. 3С).

С помощью термографии была обнаружена потеря 6,2% массы при температурах выше 200°С (Фиг. 4), связанная с наличием цитрата натрия на поверхности наночастиц. Диапазон проанализированных температур составил от 25°С до 1000°С при скорости нагрева 20 К/мин, с применением аргона при расходе 60 мл/мин.

15 Наночастицы аморфного НАр обрабатывали стерильным раствором EDC, поддерживая массовое соотношение EDC/НАр 2:1 в течение одного часа в контролируемых условиях окружающей среды. Затем суспензию обрабатывали на центрифуге при 6708 g и удаляли избыток EDC.

Пример 2. Получение системы НАр-rhEGF-rP64k за счет ковалентной связи между наночастицами аморфного НАр и конъюгатом rhEGF-rP64k

Наночастицы аморфного НАр, полученные и активированные по методике, описанной в Примере 1, смешивали в контролируемых условиях окружающей среды со стерильным раствором PBS при уровне pH 7±0,3, содержащим химический конъюгат rhEGF-rP64k, полученный по методике, описанной в патенте US 8,778,879, при массовом соотношении rhEGF-rP64k/НАр, равном 1: 2,5. Образовавшуюся суспензию выдерживали при встряхивании с частотой 140 циклов в минуту в течение 2 ч при комнатной температуре.

30 Полученную систему НАр-rhEGF-rP64k диспергировали с помощью ЭДТА, условия среды доводили до pH 7±0,3 и концентрации белка 1±0,2 мг/мл стерильными растворами PBS и гидроксида натрия.

Анализ с помощью способа динамического рассеяния света (DLS) показал присутствие наночастиц со средним гидродинамическим диаметром 97,5 нм и показателем полидисперсности 0,36. Полученная система была полидисперсной с диаметром частиц от 9 до 366 нм, измеренным по интенсивности (Фиг. 5).

5 Система наночастиц, полученная с помощью описанной ранее процедуры, была охарактеризована с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга (Фиг. 6). Электрофорез показал, что конъюгат rhEGF-rP64k имел структуру полос, аналогичную структуре в положительном контроле (то есть преобладают полосы с молекулярной массой, равной или превышающей 66 кДа), что указывает на присутствие в системе конъюгата. В анализе способом вестерн-блоттинга наблюдали полосу, сходную с полосой в контроле свободного конъюгата rhEGF-rP64k, что демонстрирует присутствие rhEGF в конъюгатах с молекулярной массой более 200 кДа. С помощью этого анализа было подтверждено, что конъюгат rhEGF-rP64k, связанный с наночастицами, способен сохранять свою структурную и функциональную целостность, что подтверждается тем фактом, что он все еще распознается антителами к EGF.

Пример 3. Система НАp-rhEGF-rP64k вызывает гуморальный ответ против EGF без видимых побочных эффектов в местах инъекций.

20 Мышей C57BL/6 (n=5) иммунизировали с помощью 63 мкг белков, содержащихся в системе, описанной в Примере 2. В качестве положительного контроля анализа применяли партию продукта, полученного по методике, описанной в патенте US 8,778,879 (Montanide-rhEGF-rP64k). Применяли протокол иммунизации, состоящий из 25 четырех доз (дни: 0, 14, 28 и 42).

За два дня до начала протокола иммунизации и на 35-й и 56-й дни в обеих группах мышей способом ферментно-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA) определяли титры суммарных IgG-антител против EGF. Соотношение (IgG2b + IgG2c)/IgG1, специфичное для EGF, в иммунной сыворотке также определяли на 56-й 30 день. Статистический анализ проводили с помощью теста сравнения средних значений Крускала-Уоллиса, и разные литеры показали статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Система НАр-rhEGF-rP64k вырабатывает антитела к EGF, которые обнаруживали в иммунной сыворотке на 56-й день при разведении 1/10000 (Фиг. 7). Этот результат демонстрирует, что связывание конъюгата rhEGF-rP64k с частицей не влияет на его целостность, и что НАр усиливает гуморальный ответ против EGF, несмотря на то, что он значительно ниже, чем у контрольной группы. С другой стороны, соотношение (IgG2b + IgG2c)/IgG1 показало отсутствие статистически значимых различий в ответах, полученных с помощью системы НАр-rhEGF-rP64k и контроля (Montanide-rhEGF-rP64k) (Фиг. 8). В обеих системах преобладали ответы гуморального типа (Th2), что делает их очень подходящими для снижения EGF в рамках лечения рака эпителиально-тканевого происхождения.

Определяли эффект системы НАр-rhEGF-rP64k в месте инъекции. С этой целью пяти мышам BALB/c вводили против-EGF систему, описанную в Примере 2 (НАр-rhEGF-rP64k), а пяти мышам вводили Montanide-rhEGF-rP64k в качестве контроля. Протокол вакцинации был аналогичен описанному ранее. После завершения эксперимента были сделаны фотографические изображения мест инъекций у мышей из двух обработанных групп. Как видно на Фиг. 9А, у мышей из контрольной группы наблюдали скопления минерального масла в местах инъекций, вызванные введением монтанида (Montanide). В противоположность, у мышей, обработанных системой НАр-rhEGF-rP64k, полученной в соответствии с процедурой, которая описана в Примере 2 (Фиг. 9В), в местах инъекций не было обнаружено никаких повреждений. Эти результаты показывают, что новая система, разработанная согласно настоящему изобретению, значительно уменьшает повреждения в месте инъекции и, таким образом, демонстрирует большой потенциал при длительном введении, в частности, для лечения рака, требующего периодических инъекций в течение нескольких лет.

Пример 4. Комбинация системы НАр-rhEGF-rP64k с адьювантами в форме частиц вызывает гуморальный ответ антитела IgG против EGF и индуцирует ответа типа Th1.

Использовали мышей C57BL/6, разделенных на три группы по пять животных в каждой. Животных иммунизировали следующим образом:

Группа 1: 63 мкг белков композиции вакцины, описанной в патенте US 8,778,879 (Montanide-rhEGF-rhP64k) (Положительный контроль).

Группа 2: 63 мкг белков системы НАр-rhEGF-rP64k с 100 мкг белков адьюванта в форме наночастиц протеолипосомы малого размера (VSSP).

Группа 3: 31,5 мкг белков системы НАр-rhEGF-rP64k и 31,5 мкг конъюгата rhEGF-rP64k, инкапсулированных в липосомные везикулы (DRV), полученные по методике дегидратации-регидратации (Kirby and Gregoriadis, Biotechnology, (1984) 2: 979-984).

Иммунизацию проводили в 0, 14-й, 28-й и 42-й дни. Забор крови осуществляли за два дня до начала протокола иммунизации и на 35-й и 56-й дни, а общие титры антител IgG против EGF в полученной сыворотке определяли с помощью ферментно-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Соотношение (IgG2b + IgG2c)/IgG1 в иммунной сыворотке, специфичное для EGF, также определяли на 56-й день. Статистический анализ проводили с помощью теста сравнения средних значений Крускала-Уоллиса, и разные литеры показали статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Выработка антител против EGF была обнаружена в трех исследованных группах. Комбинации системы НАр-rhEGF-rP64k с протеолипосомой малого размера (VSSP) и липосомами DRV вырабатывали антитела, которые выявляли в иммунной сыворотке при разведении 1/10000 и оставались одинаковыми во время двух экстракций (Фиг. 10). Было продемонстрировано наличие статистически значимых отличий данной комбинации по отношению к контролю.

На 56-й день анализ соотношения (IgG2b + IgG2c)/IgG1, специфичного для EGF, показал, что обе комбинации адъювантов давали сходные ответы, и обе они статистически были лучше по сравнению с контролем (Фиг. 11). Эти результаты продемонстрировали, что комбинация составов на основе НАр с другими адъювантами в форме частиц усиливает специфический иммунный ответ на EGF, который индуцирует превосходный ответ типа Th1, который является наиболее благоприятным для целевого лечения рака.

Пример 5. Система НАр-rhEGF-rP64k поддерживает ответ на антитела IgG против EGF, вызванный ранее с помощью Montanide-rhEGF-rP64k.

Использовали три группы мышей C57BL/6 ($n=5$), которых иммунизировали в дни: 0, 14-й, 28-й, 42-й и 70-й по следующим схемам иммунизации:

Группа 1. Контрольных мышей иммунизировали с помощью 63 мкг белков, содержащихся в системе, описанной в патенте US 8,778,879 (Montanide-rhEGF-rP64k).

Группа 2. Во время остальных проведенных иммунизаций мышей иммунизировали в 0-й день с помощью 63 мкг белков, содержащихся в системе Montanide-rhEGF-rP64k, и таким же количеством белков, содержащихся в системе HAp-rhEGF-rP64k.

5 Группы 3. Во время остальных проведенных иммунизаций мышей иммунизировали в дни 0-й и 14-й с помощью 63 мкг белков, содержащихся в системе Montanide-rhEGF-rP64k, и таким же количеством белков, содержащихся в системе HAp-rhEGF-rP64k.

10 За два дня до первой иммунизации извлекали предиммунную сыворотку, а на 35-й, 56-й и 84-й дни проводили извлечение иммунных сывороток и количественно определяли титры антител IgG против EGF с помощью ферментно-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA).

15 Титры антител против EGF обнаруживались в трех исследуемых группах без статистически значимых различий между ними, при разведении 1/50000 на 35-й день и при разведении 1/100000 на 56-й и 84-й дни (Фиг. 12). В течение исследуемого периода времени прививка системой HAp-rhEGF-rP64k была способна поддерживать ответ антител IgG против EGF, вызванный системами Montanide-rhEGF-rP64k. Этот результат подтверждает возможность замены монтанида (Montanide) на HAp в качестве адъюванта для конъюгата rhEGF-rP64k на этапе поддержки иммунного ответа против EGF, и его пригодность для длительного лечения рака эпителиального происхождения.

20 **Пример 6. Формирование системы HAp-PI путем ковалентного связывания белков rhEGF и rP64k на поверхности наночастиц аморфного HAp**

25 Полученные по методике, описанной в Примере 1, наночастицы HAp, предварительно покрытые цитратом натрия и активированные EDC, смешивали в контролируемых условиях окружающей среды со стерильным раствором PBS, pH $7\pm 0,3$, содержащим rhEGF и rP64k в молярном соотношении rhEGF на rP64k, равном 6, при массовом соотношении белков/HAp, равном 1: 2,5. Образовавшуюся суспензию выдерживали при встряхивании с частотой 140 циклов в минуту в течение 2 ч при комнатной температуре. С помощью этой процедуры получали систему rhEGF-HAp-rP64k, отличающуюся тем, что белки связаны с наночастицей HAp, но не друг с другом.

30 Указанную систему диспергировали с помощью ЭДТА, доводя pH до $7\pm 0,3$ и концентрацию белка до $1\pm 0,2$ мг/мл.

На Фиг. 13 показан профиль размера частиц, измеренный способом динамического рассеяния света (DLS). Средний диаметр составил 111,2 нм при показателе

полидисперсности 0,347. С точки зрения размера, полидисперсности и профилей DLS, полученная система была аналогична системе, полученной в Примере 2. Вышеупомянутые аспекты показывают, что когда rhEGF и rP64k связаны с наночастицами НАр, но не друг с другом, они обладали дисперсией, аналогичной дисперсии конъюгата rhEGF-rP64k.

Как видно на Фиг. 14А, где представлены результаты анализа с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), на дорожке, соответствующей системе НАр-PI, появляется основная полоса высотой 66 кДа, характерная для белка rP64k, и другая полоса, высота которой сходна с контролем rhEGF (6 кДа). Эти результаты показали, что оба рекомбинантных белка были связаны с наночастицами НАр и что при восстановлении они сохраняли свою характерную молекулярную массу, поскольку они не были связаны друг с другом.

Как видно на Фиг. 14В, на дорожках 1 и 2 имеется полоса высотой примерно 66 кДа, что подтверждает присутствие белка rP64k в системе НАр-PI, а также то, что белок сохраняет свою целостность, когда он связан с наночастицами НАр.

Пример 7. Формирование системы НАр-СМ на поверхности наночастиц аморфного НАр с помощью множественной конъюгации белков rhEGF и rP64k

Наночастицы аморфного НАр, полученные в Примере 1, обрабатывали в контролируемых условиях окружающей среды в течение 1 ч стерильным раствором EDC, поддерживая массовое соотношение EDC и НАр на уровне 2,7. Далее добавляли стерильный раствор PBS с показателем pH $7 \pm 0,3$, содержащий rhEGF и rP64k в молярном соотношении rhEGF на rP64k, равном 6, при массовом соотношении белков/НАр, равном 1:2,5. Образовавшуюся суспензию выдерживали при встряхивании с частотой 140 циклов в минуту в течение 2 ч при комнатной температуре.

В результате этой процедуры была получена система, образованная наночастицами НАр, которые покрыты обоими рекомбинантными белками, связанными как друг с другом, так и с наночастицами. Эту систему диспергировали с помощью ЭДТА и pH доводили до $7 \pm 0,3$. Затем его разбавляли раствором PBS до достижения концентрации белка $1 \pm 0,2$ мг/мл.

С помощью ранее описанной множественной конъюгации была получена сложная система НАр-rhEGF-rP64k со средним размером 90,2 нм, измеренным способом динамического рассеяния света (DLS), и индексом полидисперсности 0,337 (Фиг. 15).

5 Определение характеристик, выполненное с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга, показали конъюгацию указанных белков. Был получен продукт, аналогичный положительному контролю rhEGF-rP64k, который распознает антитела против EGF (Фиг. 16).

Пример 8. Новые системы, сформированные на наночастицах НАр, вызывают гуморальный ответ антител IgG против EGF и вызывают меньшее количество эпидермальных поражений в месте инъекции

Три группы по пять мышей типа C57BL/6 в каждой были иммунизированы с помощью 63 мкг белков, содержащихся в следующих системах:

15 Группа 1: Система НАр-rhEGF-rhP64k, полученная по методике, описанной в Примере 2.

Группа 2: Система НАр-PI, полученная по методике, описанной в Примере 6.

Группа 3: Система НАр-СМ, полученная по методике, описанной в Примере 7.

20 Иммунизации проводили в 0, 14-й, 28-й и 42-й дни. Забор крови проводили за двое суток до начала протокола и на 35-й и 56-й день. Общие титры антитела IgG против EGF в полученных сыворотках определяли с помощью ферментно-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Соотношение (IgG2b + IgG2c)/IgG1 в иммунной сыворотке, специфичное для EGF, также определяли на 56-й день. Статистический анализ проводили с помощью теста сравнения средних значений Крускала-Уоллиса, и разные литеры показали статистически значимые различия ($p < 0,05$).

25 Системы НАр-rhEGF-rP64k и НАр-СМ вырабатывали антитела к EGF, которые выявляли в иммунной сыворотке при разведении до 1/10000 и в системе НАр-PI при разведении до 1/8000 на 35-й и 56 (Фиг. 17). Были подтверждены результаты, полученные с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга (Примеры 6 и 7), и было
30 продемонстрировано, что все системы, построенные на наночастицах НАр, являлись иммуногенными, хотя в системе НАр-PI элемент rhEGF не имеет ковалентной связи с rP64k. Эта система является доказательством того, что возможно получение систем,

которые вызывают иммунный ответ против EGF без необходимости химического связывания rhEGF с белком-носителем.

Анализ соотношения (IgG2b IgG2c)/IgG1 показал отсутствие статистически значимых различий в вызываемом ими ответе. Преобладали ответы гуморального типа (Th2), что делает их подходящими для снижения EGF в рамках лечения рака эпителиально-тканевого происхождения. (Фиг. 18).

5 Через 120 дней после начала эксперимента мышей C57BL/6 умерщвляли и извлекали из мест инъекций образцы тканей для патологоанатомического анализа, предварительно окрашивая их гематоксилин-эозином. Срезы тканей фиксировали в нейтральном забуференном формалине и обрабатывали методом заливки парафином. Как можно видеть на Фиг. 19А-С, которая показывает результаты для контрольной группы (Montanide-rhEGF-rP64k), в месте прививки наблюдается потеря нормальной структуры мышечной ткани. Зона А характеризуется воспалительным инфильтратом и расширенными кровеносными сосудами с нарушением целостности прилегающей мышечной ткани. На Фиг. 19В и С можно наблюдать продольные (В) и поперечные (С) волокна прилегающей мышечной ткани в месте прививки с инвазией реакции фибробластной восстановительной ткани. Однако на Фиг. 19D-F, которые представляют результаты лечения мышей новой системой, являющейся задачей настоящего изобретения, можно наблюдать нормальную структуру в месте прививки и прилегающей мышечной ткани. D: HAp-rhEGF-rP64k. E: HAp-СМ. F: HAp-PI.

У каждой мыши из трех предыдущих групп оценивали наличие или отсутствие следующих поражений:

- Неоднородность эпидермиса и лимфоцитарная инфильтрация дермы.
- Воспалительный инфильтрат.
- 25 • Инвазия мышечной ткани.
- Вакуолярная дегенерация эпителиальных клеток.
- Расширенные кровеносные сосуды.

Каждый раз, когда обнаруживали поражение, добавляли точку, значения, соответствующие каждой мыши в группах, складывали, а результат отображали в виде графика.

Исследование показало, что в группах, обработанных системами, разработанными в соответствии с настоящим изобретением, наблюдали очень незначительное количество поражений, в отличие от наблюдаемых в контрольной группе, привитой

системой Montanide-rhEGF-rP64k (Фиг. 20). Этот результат подтверждает визуальные наблюдения в Примере 3.

Эти результаты подтверждают низкую токсичность против-EGF систем на основе наночастиц НАр и незначительные побочные эффекты в местах инъекций, вызванные 5 минеральным маслом, которое содержится в системе Montanide-rhEGF-rP64k.

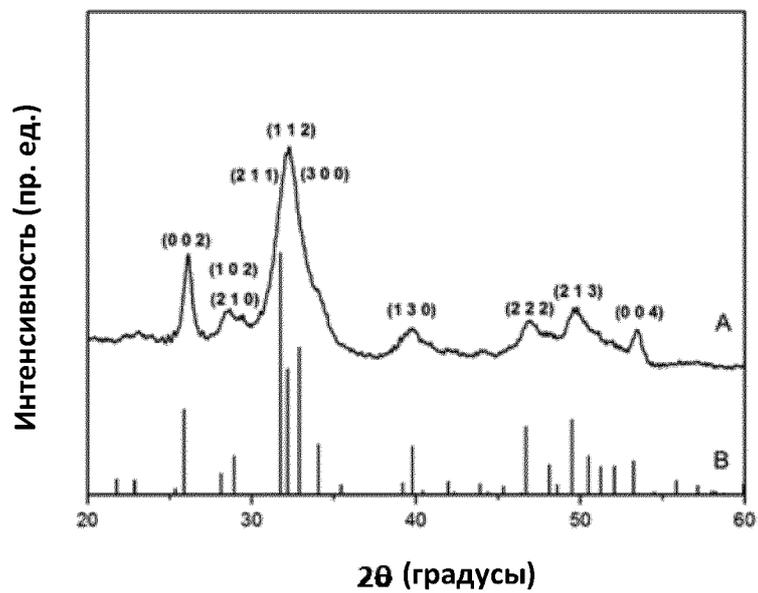
КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА, ОСНОВАННЫЕ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

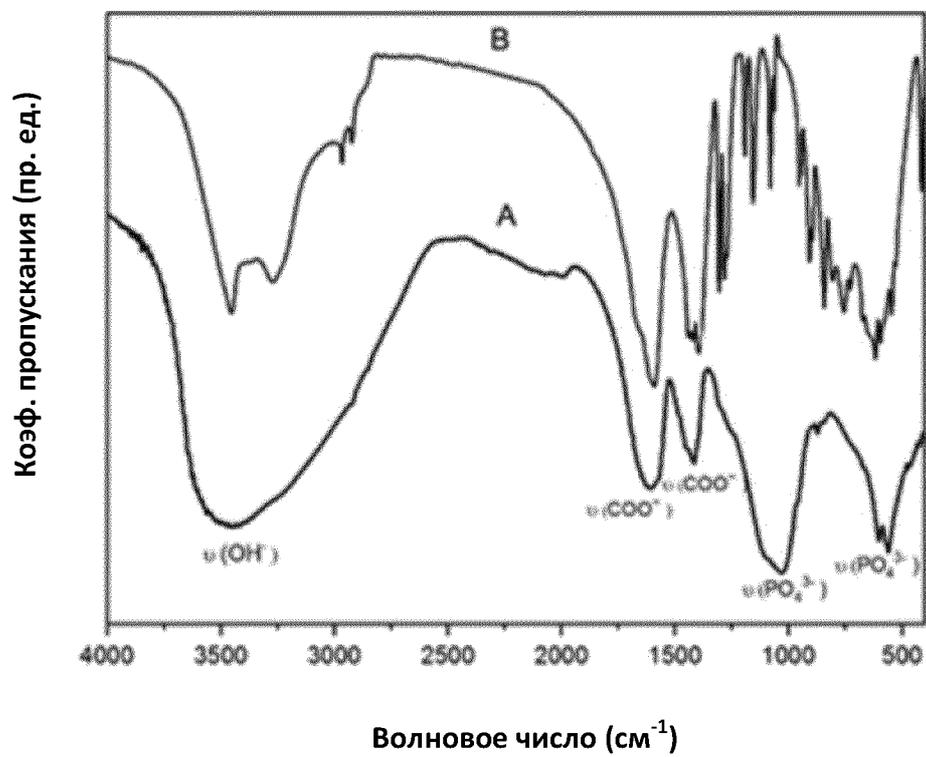
1. Композиция вакцины для вызова иммунного ответа против эпидермального фактора роста (EGF), содержащая в качестве активного начала систему, которая содержит рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста (rhEGF) или его пептиды, и белок-носитель, связанный с ядром, образованным неорганическими наночастицами.
2. Композиция вакцины по п. 1, отличающаяся тем, что неорганическое ядро образовано солями, оксидами или гидроксидами, выбранными из группы, включающей в себя: кальций, железо, цинк, магний, цирконий, церий, бериллий, кремний или смесь двух или более из них.
3. Композиция вакцины по п. 1, отличающаяся тем, что неорганическое ядро образовано из фосфата кальция.
4. Композиция вакцины по п. 1, отличающаяся тем, что фосфат кальция представляет собой гидроксиапатит (НАр).
5. Композиция вакцины по п. 1, отличающаяся тем, что НАр относится к аморфному типу.
6. Композиция вакцины по п. 1, отличающаяся тем, что НАр имеет низкую кристалличность.
7. Композиция вакцины по любому из пунктов 1–6, отличающаяся тем, что гидроксиапатит частично покрыт органическим лигандом.
8. Композиция вакцины по п. 7, отличающаяся тем, что органический лиганд представляет собой цитрат натрия.
9. Композиция вакцины по п. 1, отличающаяся тем, что белок-носитель выбран из группы, включающей в себя:
 - субъединицу В холерного токсина,
 - столбнячный анатоксин,
 - гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH) и
 - P64k *Neisseria meningitidis*.
10. Композиция вакцины по любому из пунктов 1–9, отличающаяся тем, что активное начало расположено на поверхности наночастицы НАр.

11. Композиция вакцины по п. 8, отличающаяся тем, что активное начало связано с наночастицей НАр одним из следующих способов:
 - Ковалентная связь химического конъюгата rhEGF или его пептидов и белка-носителя или пептида с наночастицей НАр.
 - Ковалентная связь rhEGF или его пептидов и белка-носителя или пептида с наночастицей НАр независимым образом.
 - Последовательная ковалентная связь rhEGF или его пептидов и белка-носителя или пептида с наночастицей НАр.
 - Множественная конъюгация между rhEGF или его пептидами и белком-носителем или пептидом на поверхности НАр.
 - Инкапсуляция или физическая адсорбция rhEGF и белка-носителя или пептида на поверхности НАр.
12. Композиция вакцины по любому из пунктов 1–9 в комбинации с другими адъювантами, которые выбраны из группы, включающей в себя:
 - неполные адъюванты Фрейнда,
 - адъюванты на основе сквалена,
 - адъюванты синтетического происхождения,
 - адъюванты минерального происхождения,
 - адъюванты растительного происхождения,
 - адъюванты животного происхождения,
 - адъюванты с белковыми частицами и
 - липосомами.
13. Применение композиции вакцины по любому из пунктов 1–10 для длительного лечения рака.
14. Способ лечения пациента, нуждающегося в этом, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества композиции вакцины по любому из пунктов 1–9.
15. Способ по п. 12, в котором предшествующую стадию вызова иммунного ответа достигают с помощью другой композиции вакцины против эпидермального фактора роста (EGF).

ФИГ. 1

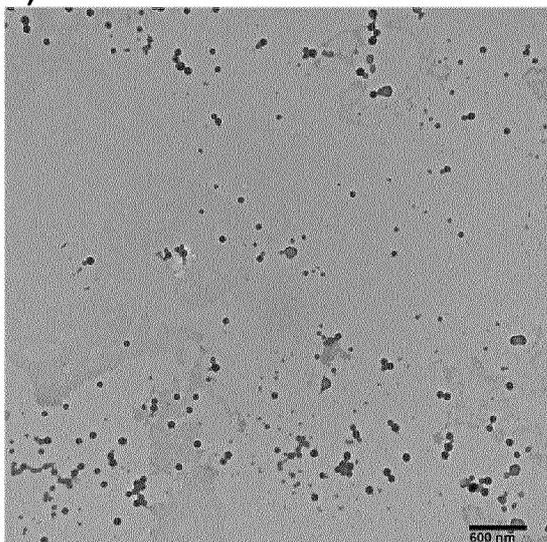


ФИГ. 2

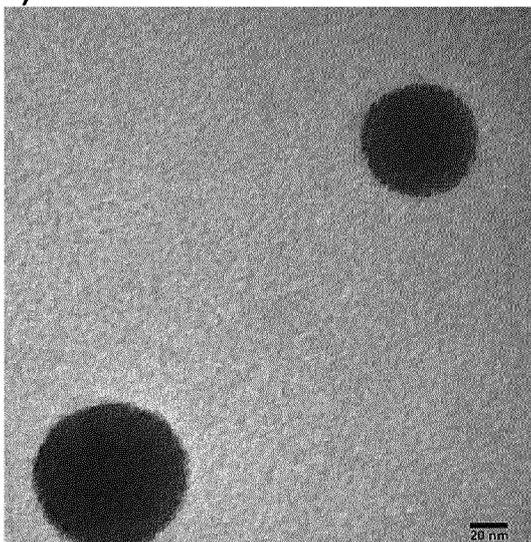


ФИГ. 3

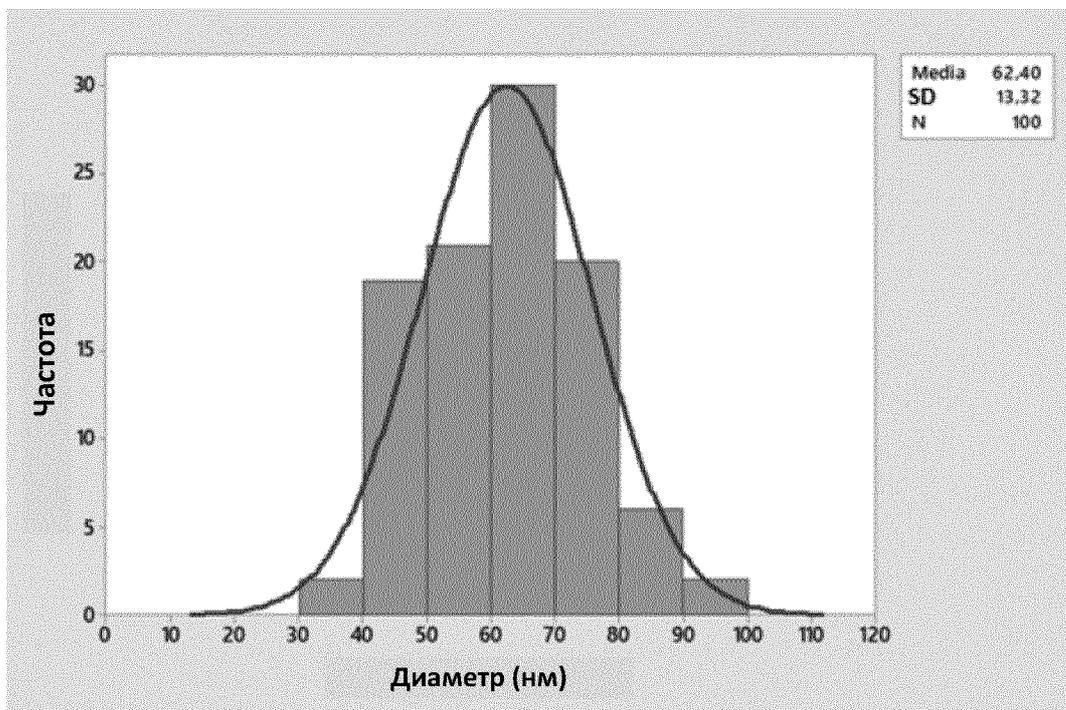
A)



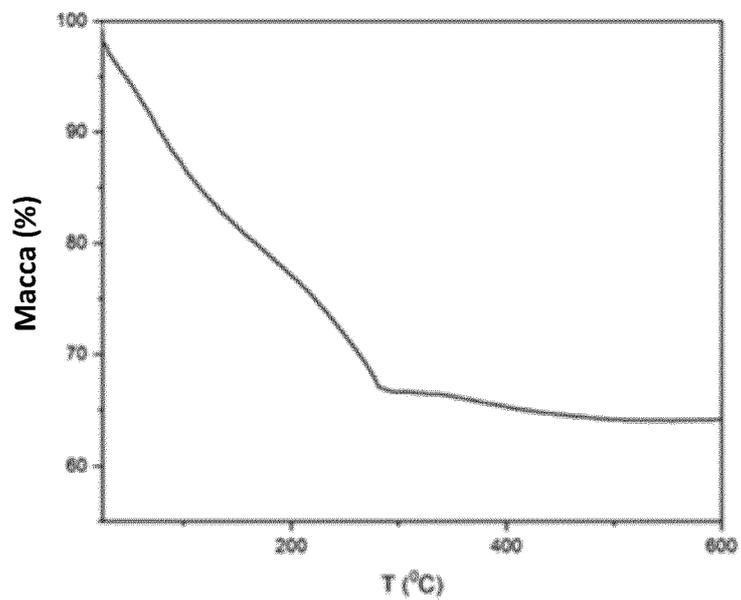
B)



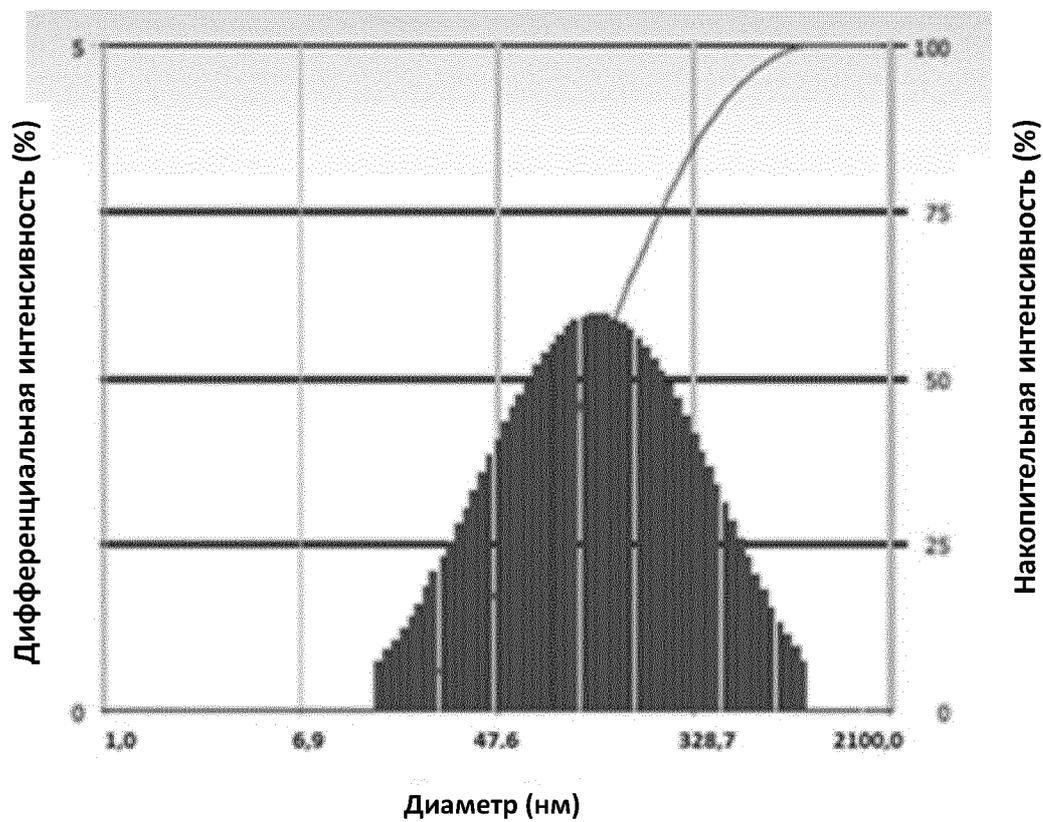
C)



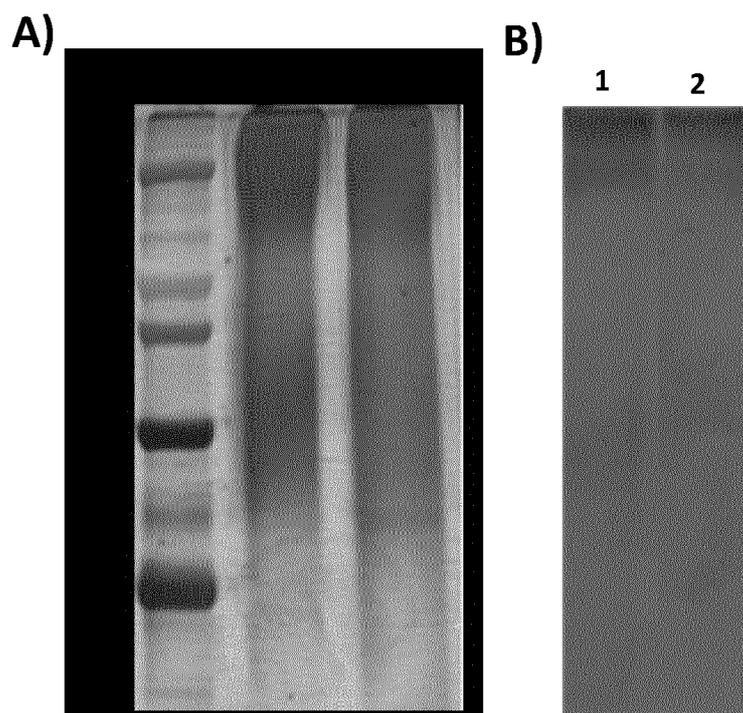
ФИГ. 4



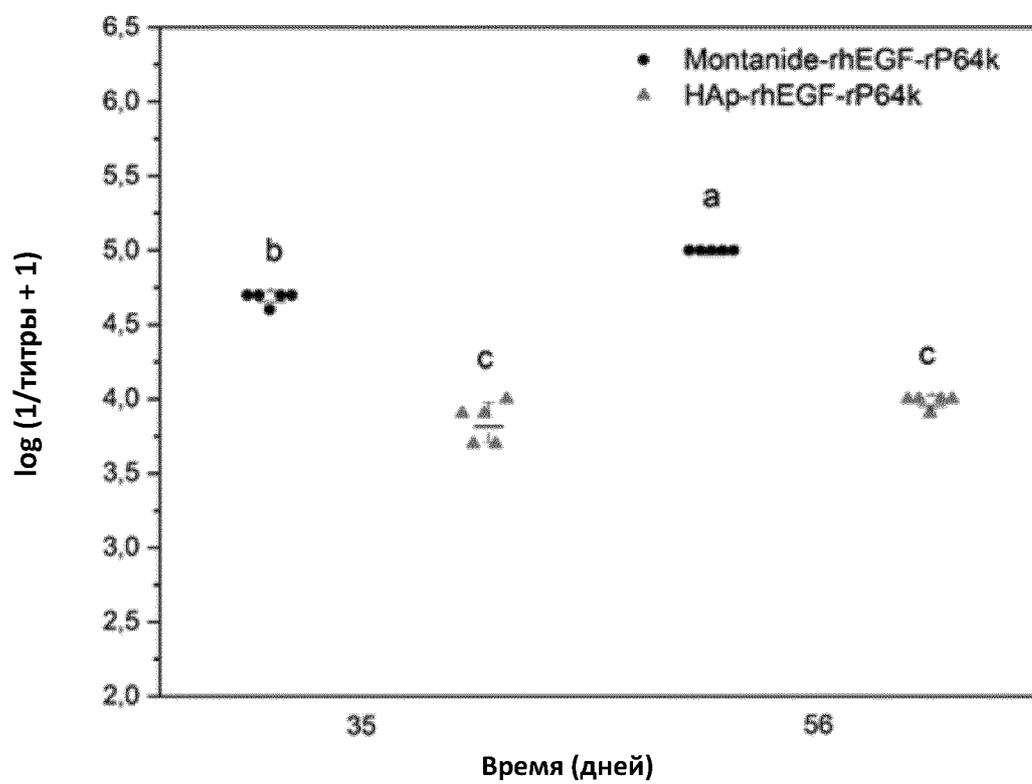
ФИГ. 5



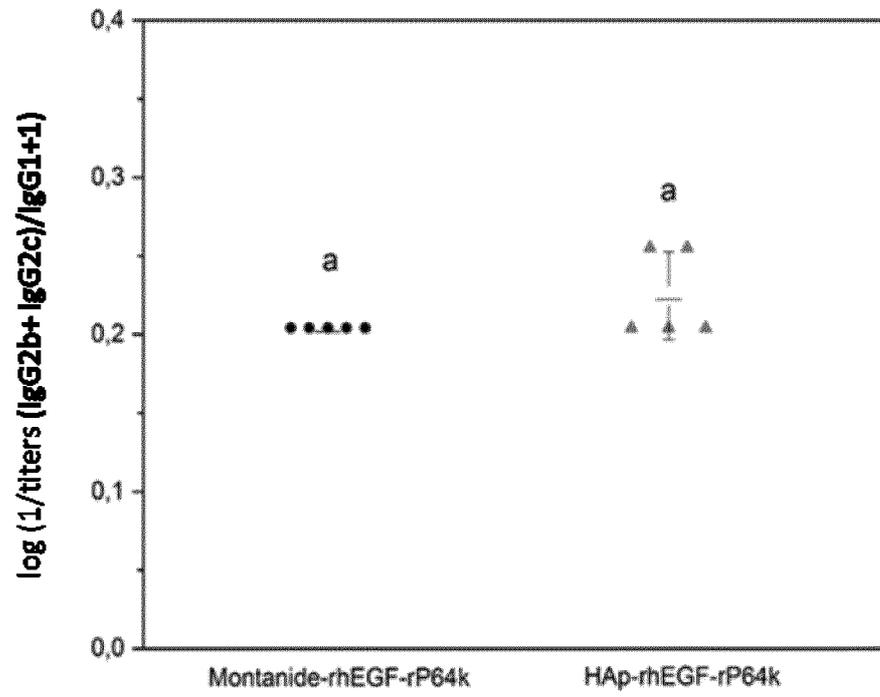
ФИГ. 6



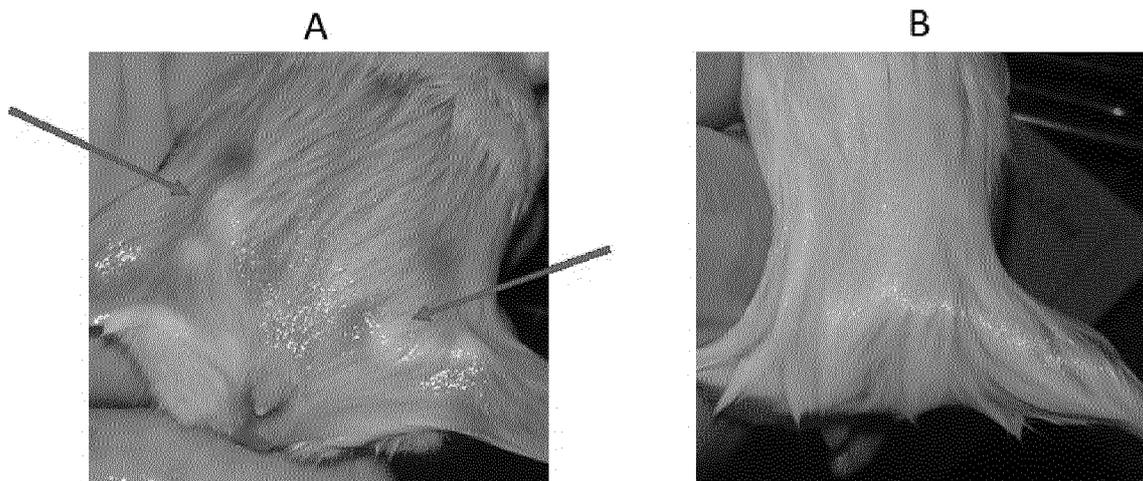
ФИГ. 7



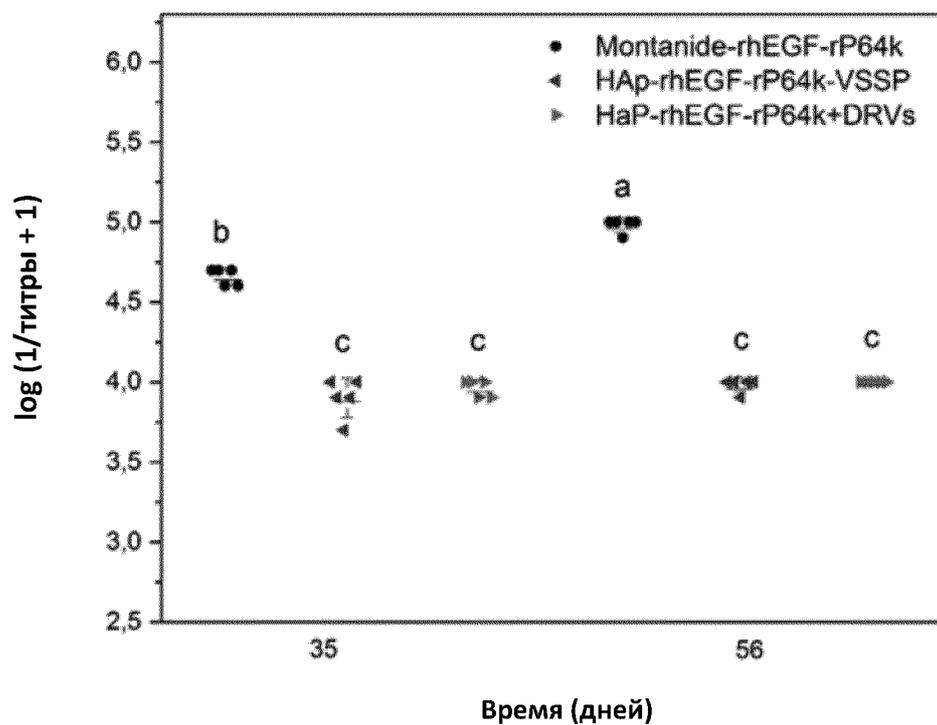
ФИГ. 8



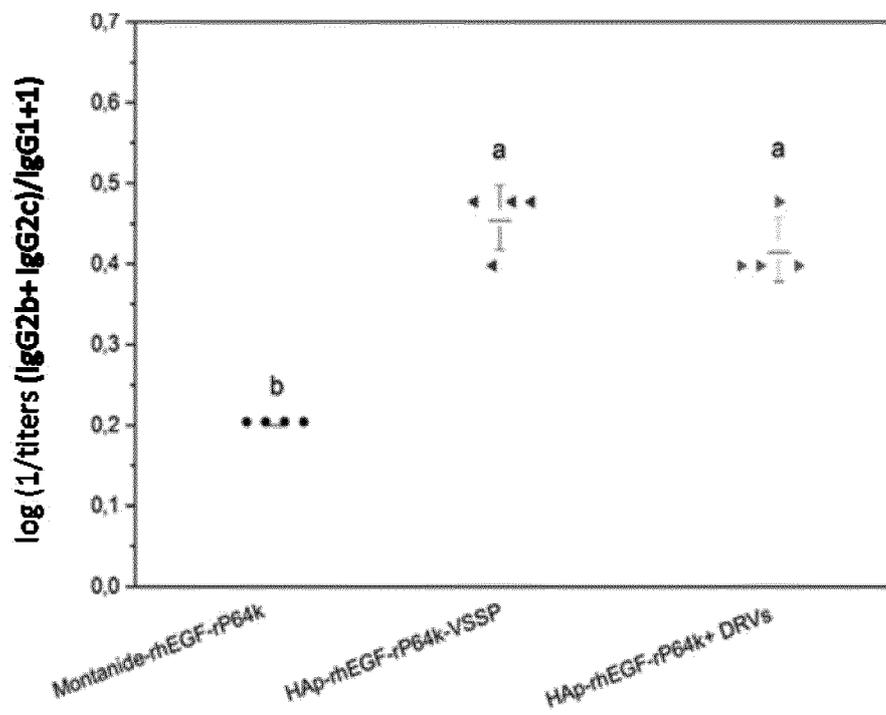
ФИГ. 9



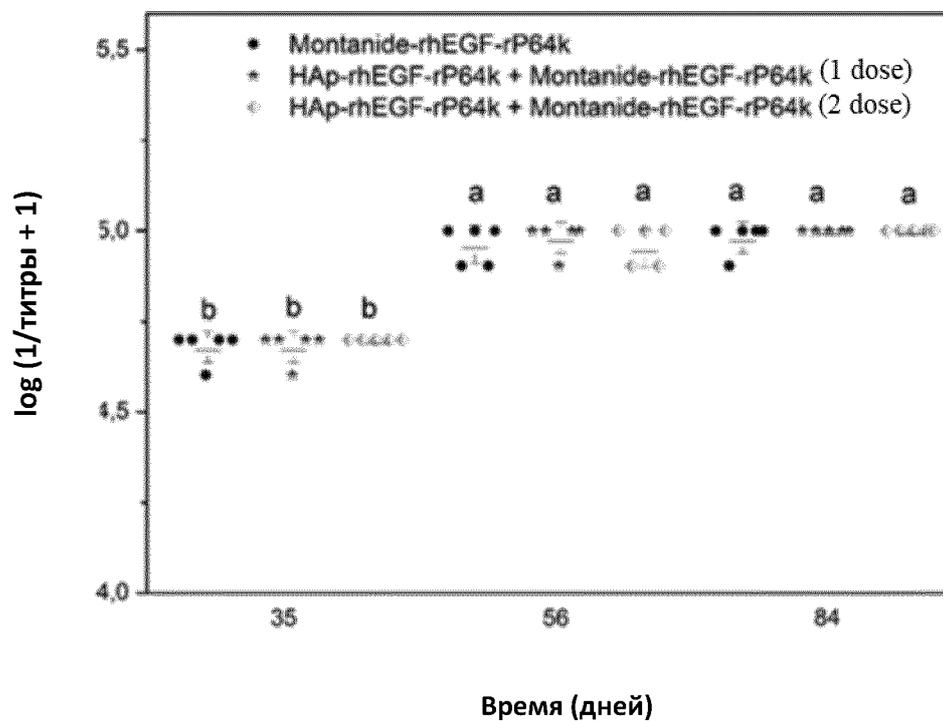
ФИГ. 10



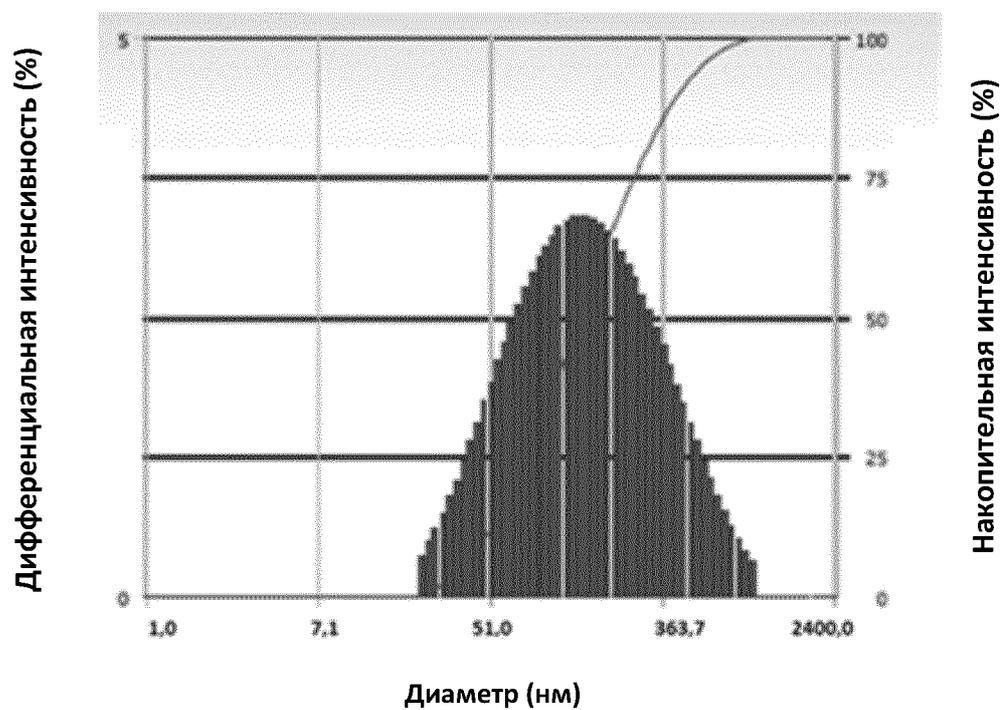
ФИГ. 11



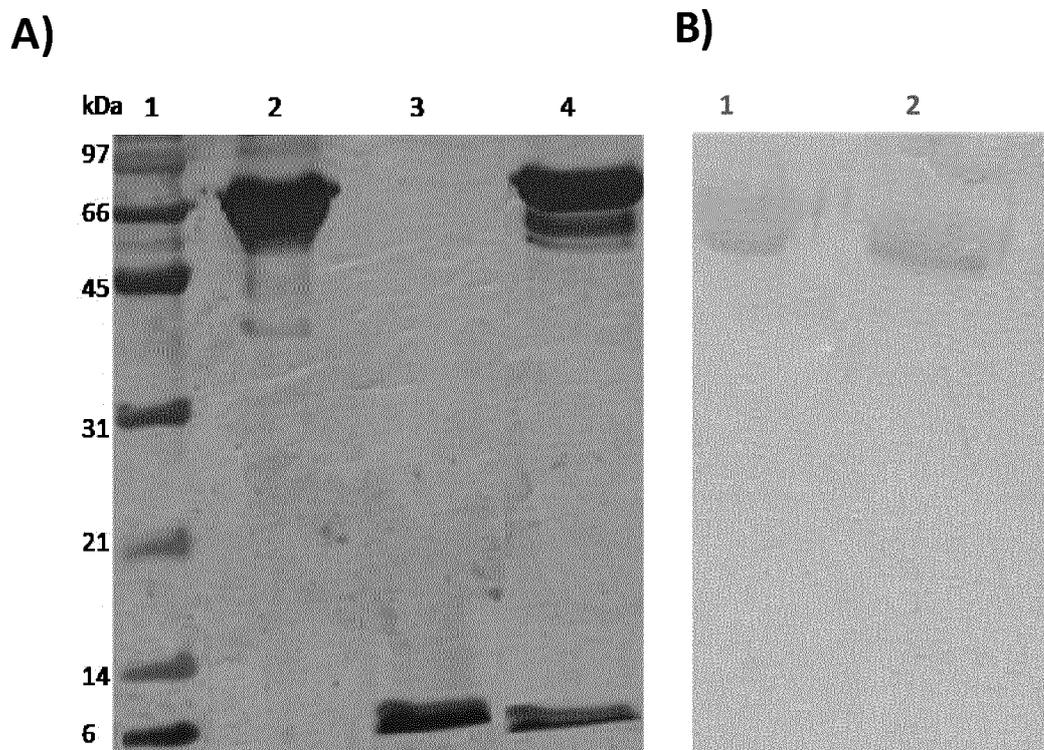
ФИГ.12



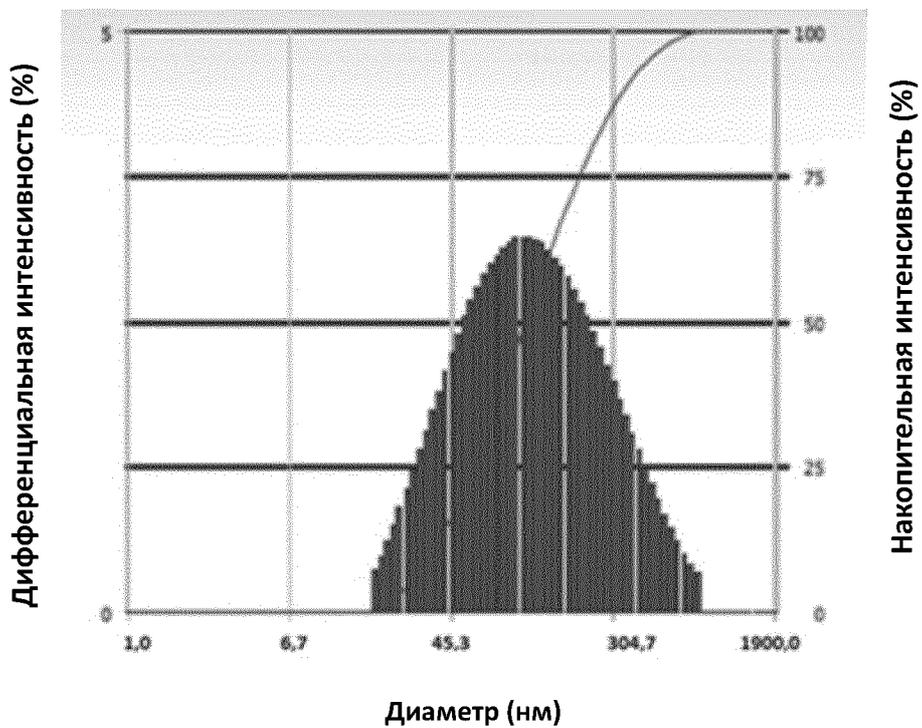
ФИГ. 13



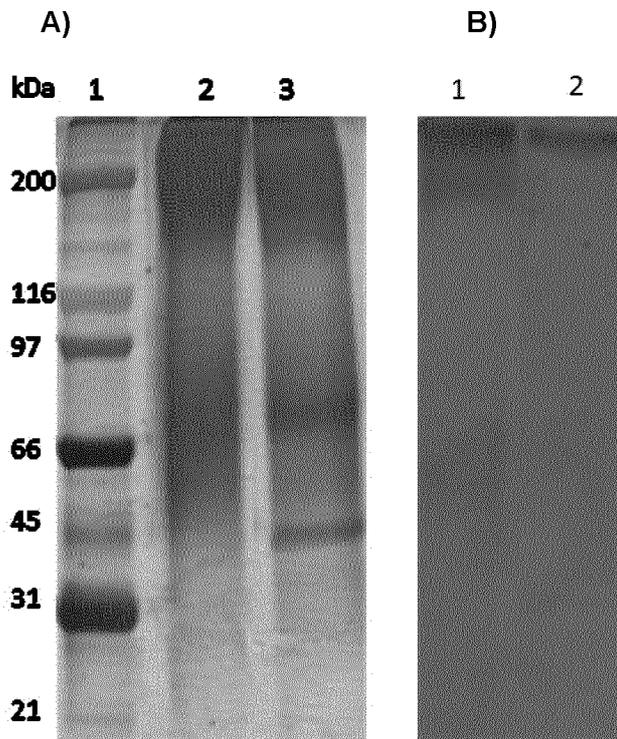
ФИГ. 14



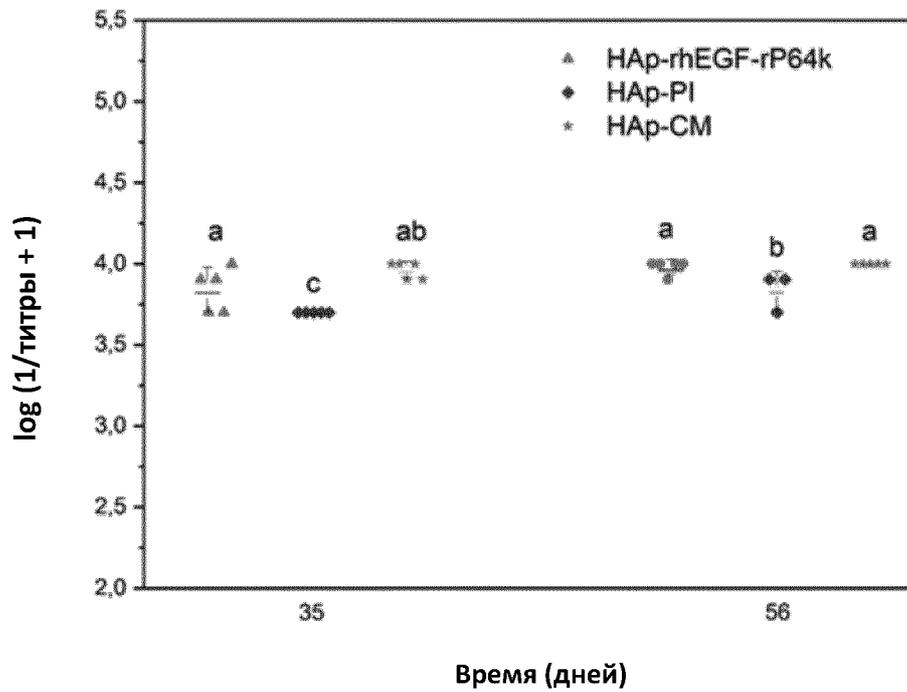
ФИГ. 15



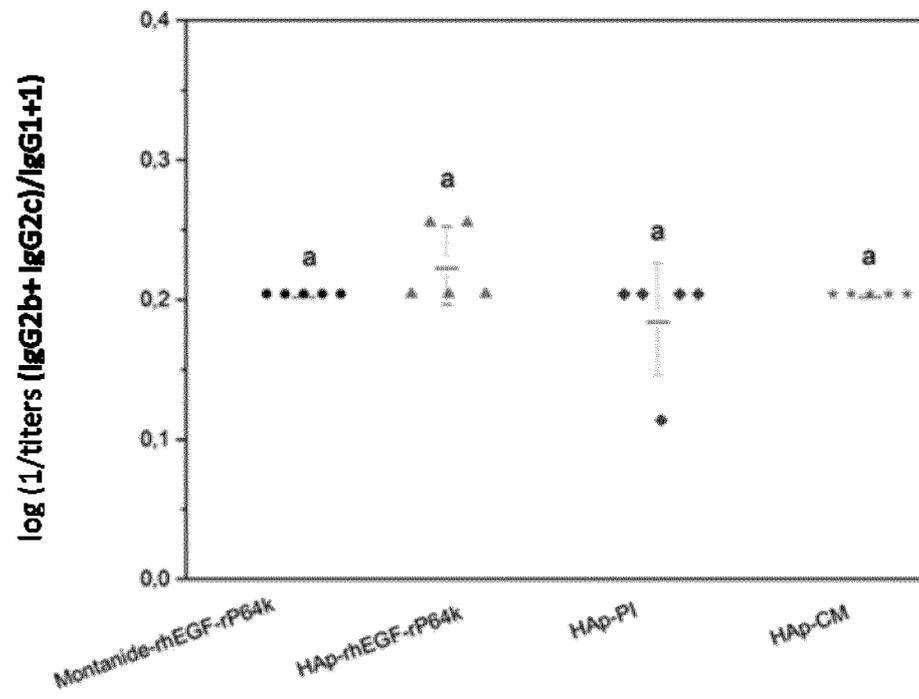
ФИГ. 16



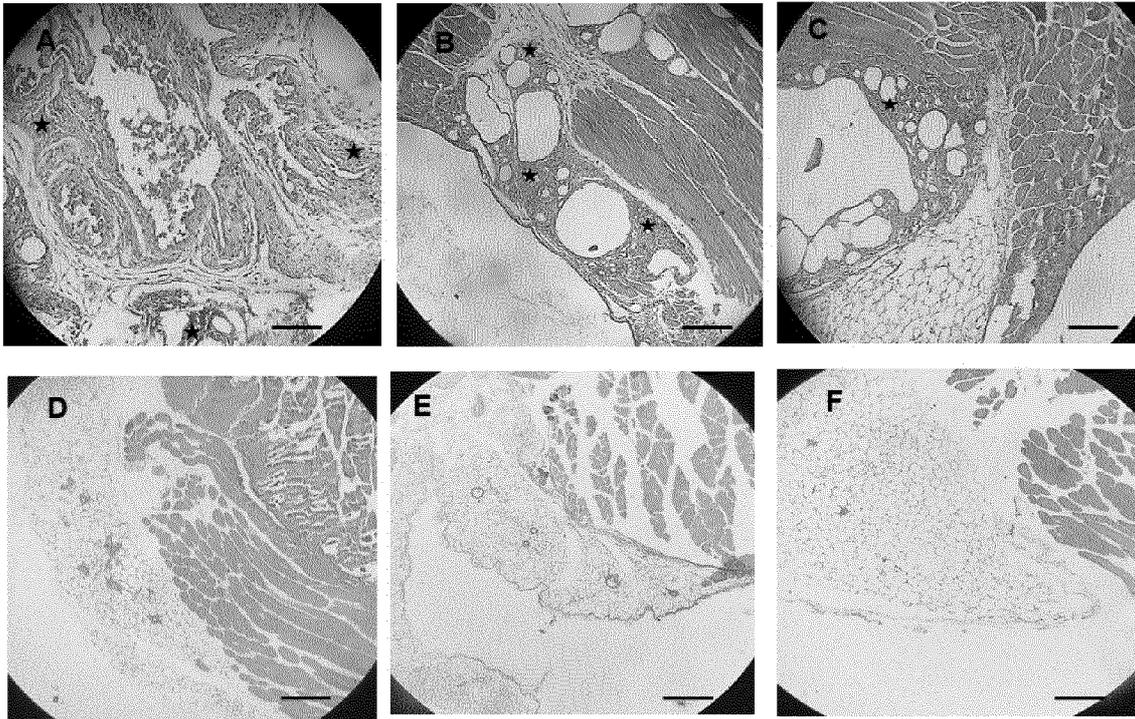
ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20

