

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992367 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.04

(54) ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ, СПОСОБЫ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

(31) 62/481,432; 62/617,519

(72) Изобретатель:
Линн Джефри, Ишизука Андрою (US)

(32) 2017.04.04; 2018.01.15

(33) US

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

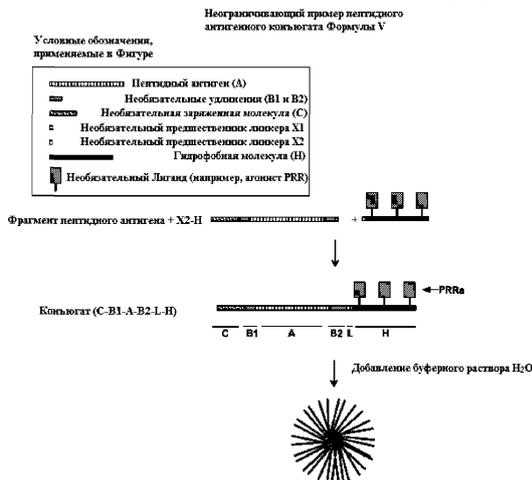
(86) PCT/US2018/026145

(87) WO 2018/187515 2018.10.11

(71) Заявитель:

АВИДЕА ТЕХНОЛОДЖИС, ИНК.;
ЗЕ ЮНАЙТИД СТАЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТИД БАЙ
ЗЕ СЕКРЕТЕРИ, ДЕПАРТМЕНТ ОФ
ХЕЛС ЭНД ХЬЮМЭН СЕРВИСИС
(US)

(57) Настоящее изобретение относится к новым вакцинам на основе пептидов, способам изготовления новых вакцин на основе пептидов и к их применению для доставки пептидных антигенов для индукции иммунного ответа, и в частности Т-клеточного ответа у субъекта.



A1

201992367

201992367

A1

**ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ, СПОСОБЫ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И
ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИМУННОГО ОТВЕТА
ПРИОРИТЕТНЫЙ ДОКУМЕНТ**

[0001] Настоящая заявка претендует на приоритет согласно Предварительной заявке на Патент США № 62/481,432, поданной 4 апреля 2017 г., и Предварительной заявке на Патент США № 62/617,519, поданной 15 января 2018 г., при этом, обе эти заявки озаглавлены следующим образом: «ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ, СПОСОБЫ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИМУННОГО ОТВЕТА», содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0002] Настоящее изобретение было создано во исполнение Соглашения о совместном проведении исследований с Национальными институтами здравоохранения, Агентством департамента здравоохранения и социальных служб. Правительство Соединенных Штатов Америки имеет определенные права на настоящее изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится к новым вакцинам на основе пептидов, способам изготовления новых вакцин на основе пептидов и к их применению для индуцирования иммунного ответа, и, в частности, Т-клеточного ответа у субъекта. Варианты осуществления вакцин на основе пептидов по настоящему изобретению могут применяться для профилактики или лечения инфекционных заболеваний и рака, а также для индуцирования толерантности или для модулирования иммунитета для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Вакцины, содержащие иммуногенные композиции антигенов, могут применяться для индукции иммунного ответа у субъекта, в том числе, для лечения или профилактики раковых или инфекционных заболеваний, или даже для индуцирования толерантности и/или иммунной супрессии для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний или аллергических реакций. Композиции вакцин для индуцирования иммунных ответов для лечения или профилактики раковых и инфекционных заболеваний содержат антигены и специфические типы адъювантов, которые индуцируют цитотоксические Т-клеточные ответы и/или антитела, направленные на антиген, который опосредуют клиренс патогенов или уничтожение клеток, инфицированных вирусами, или раковых клеток. В то же время, композиции вакцин для индуцирования толерогенных или супрессивных ответов могут содержать антиген и носитель (например, систему доставки, такую как, носитель частиц) и/или иммуносупрессивные соединения, такие как,

ингибиторы mTOR, но они будут лишены специфических адъювантов, которые индуцируют цитотоксические Т-клетки, но вместо этого, они могут индуцировать толерантность Т-клеток или активацию регуляторных клеток, таких как, регуляторные Т-клетки, которые подавляют или модулируют качественные характеристики ответа.

[0005] Растет признание того факта, что генетический фон, в частности, композиция аллелей главного комплекса гистосовместимости (МНС), и окружающая среда пациента могут нежелательно воздействовать на их восприимчивость к раку, инфекционным заболеваниям, аутоиммунным заболеваниям и аллергическим реакциям, а также влиять на их ответ на вакцины, применяемые для лечения таких состояний здоровья. Непрерывное развитие новых способов диагностики и информатики, которые предлагают понимание молекулярной основы заболевания, привело к тому, что специфическая информация о пациентах становится все более доступной. Таким образом, возрастает интерес к применению информации о генах, белках и окружающей среде индивидуума для направления лечебного процесса, проводимого у индивидуума, включая отбор конкретных иммунотерапевтических механизмов, включая вакцины для лечения или профилактики рака, инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций.

[0006] В терапии рака, специфическая информация об опухоли индивидуума может применяться для оказания помощи в диагностировании, планировании лечения, для выявления эффективности лечения или для составления прогноза заболевания. Например, специфическая информация о генах, белках и окружающей среде индивидуума может применяться для разработки индивидуального профилактического подхода к лечению рака путем разработки вакцин на основе такой информации. Вакцины, применяемые для лечения иммунологических заболеваний или для профилактики определенных раковых заболеваний, должны индуцировать иммунный ответ на опухолеассоциированные антигены. Одним из предпочтительных иммунных ответов является CD8 Т-клеточный ответ и/или CD4 Т-клеточный ответ, который распознает опухолеассоциированный антиген.

[0007] Аналогичным образом, индивидуализированные подходы к лечению аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций возможны посредством идентификации специфических собственных антигенов или чужеродных антигенов, соответственно, являющихся причиной иммуноопосредованной патологии. Хотя некоторые аутоантигены и аллергены известны и распространены у пациентов, некоторые аутоантигены и аллергены могут являться специфическими для пациентов, и поэтому лечение этих пациентов необходимо разрабатывать индивидуально. Антигены,

идентифицированные как причина патологии, могут вводиться в форме пептида в качестве вакцины, которая способна индуцировать толерантность к аутоантигенам (то есть, к собственным антигенам). В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, иммунный ответ на чужеродный антиген, который вызывает аллергические реакции, может представлять собой конкретный тип иммунного ответа, который приводит к патологии. Таким образом, вакцина против такого чужеродного антигена может быть предложена в виде вакцины на основе пептидов для сдвига иммунного ответа к качественно отличному типу иммунного ответа, который не приводит к патологии.

Роль Т-клеток в лечении или профилактике рака

[0008] Известно, что Т-клетки опосредуют регрессию опухоли и улучшают выживаемость пациентов, как было показано при применении иммунотерапевтических механизмов на основе адоптивной Т-клеточной терапии и ингибиторов контрольных точек иммунного ответа. Некоторые исследования, проведенные на людях, показали, что внутривенная инфузия большого количества размноженных CD8 и/или CD4 Т-клеток, которые распознают одиночный опухолеассоциированный антиген, может опосредовать регрессию опухоли и улучшить выживаемость (см.: Е. Трэн и др., *N Engl J Med* 375:2255-2262, 2016; и Е. Трэн и др., *Science* 344: 641-645, 2014). Кроме того, лечение определенных раковых заболеваний лекарственными препаратами, блокирующими или вызывающими обратную супрессию Т-клеток, такими как, моноклональные антитела, блокирующие CTLA-4, PD-1 и/или PD-L1 (именуемые «ингибиторами контрольных точек»), приводит к регрессии опухоли и улучшению общей выживаемости (см.: Д.М. Пэрдолл, *Nat Rev Cancer*, 12: 252-264, 2012; Ф.С. Ходи и др., *N Engl J Med*, 363:711-723, 2010; и, М. Рек и др., *N Engl J Med*, 375: 1823-1833, 2016; Дж.Е. Розенберг и др., *Lancet* 387: 1909-1920, 2016). PD-1/PD-L1 представляет собой пару рецептор-лиганд, при этом, PD-1 экспрессируется на Т-клетках, а PD-L1 экспрессируется на клетках в опухоли. Взаимодействие PD-1/PD-L1 блокирует выполнение Т-клетками своих эффекторных функций, что в противном случае привело бы к замедлению роста или элиминации опухолевых клеток, экспрессирующих опухолеассоциированный антиген, распознанный Т-клеткой. Блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1 с моноклональным антителом приводит к прекращению супрессивного сигнала, тем самым высвобождая Т-клетки для выполнения эффекторной функции, что приводит к замедлению роста опухолевых клеток или к гибели опухолевых клеток (Д.М. Пэрдолл, *Nat Rev Cancer*, 12: 252-264, 2012).

[0009] Роль Т-клеток в стимулировании клиренса опухоли у пациентов подтверждается исследованиями, проведенными на людях, которые показывают, что ингибиторы контрольных точек имеют более высокую эффективность (более низкую

смертность) у пациентов с более высоким уровнем инфильтрации Т-клеток, присутствующим в биопсии их опухоли на момент начала лечения (см.: Дж.Е. Розенберг и др., Lancet 387: 1909-1920, 2016). Кроме того, было также показано, что ингибиторы контрольных точек имеют более высокую эффективность у пациентов, опухоли которых имеют более высокий уровень мутаций (см.: А. Снайдер и др., N Engl J Med 371, 2189-2199 2014; и Н.А. Ризви и др., Science, 348: 124-128, 2015) предположительно потому, что увеличение количества мутаций приводит к увеличению количества мутантных белков, тем самым обеспечивая большее количество потенциальных мишеней, у которых Т-клетки могут распознавать опухолевые клетки и нацеливать их на элиминацию.

[0010] Однако основная проблема заключается в том, что многие распространенные опухоли (например, рак предстательной железы, молочной железы и поджелудочной железы) имеют низкую мутационную нагрузку (см.: Т.Н. Шумахер, Р.Д. Шрайбер, Science, 348: 69-74, 2015), и пациенты с этими раковыми заболеваниями получают мало пользы или практически ее не получают от ингибиторов контрольных точек.

Кроме того, даже среди опухолей, которые имеют высокую мутационную нагрузку, только подгруппа пациентов получает пользу от терапии ингибиторами контрольных точек, потому что у большинства пациентов отсутствует необходимый предшествующий опухолеспецифичный Т-клеточный ответ, который требуется иммунотерапевтическим механизмам для опосредования эффекта.

Вакцины, нацеленные на опухолеассоциированные антигены для лечения или профилактики рака

[0011] Генерирование иммунных ответов, в частности, Т-клеточных ответов, для лечения или профилактики рака требует идентификации подходящих опухолеассоциированных антигенов. Опухлеассоциированные антигены включают собственные антигены, которые присутствуют на определенных здоровых клетках, но преимущественно экспрессируются опухолевыми клетками; патоген-опосредованные антигены, полученные из онкогенных микробных патогенов; и/или неоантигены, которые представляют собой aberrantные белки, являющиеся специфическими для опухолевых клеток, и зачастую, но не всегда, уникальными для отдельных пациентов.

[0012] Подходящими собственными антигенами могут быть антигены, полученные из белков, которые больше не экспрессируются у субъектов, находящихся в послеродовом состоянии. Например, подходящие собственные антигены могут включать антигены, которые преимущественно экспрессируются опухолевыми клетками, такие как, NY-ESO-1 и MAGE-A3 (см.: Н.Н. Хундер и др., N Engl J Med, 358:2698-2703, 2008). В

альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, собственные антигены могут включать антигены, которые экспрессируются в здоровой ткани, при этом, Т-клеточный ответ на эту здоровую ткань не является чрезмерно вредным для пациента, например, простатическая кислая фосфатаза (PAP) (см.: П.В. Кэнтофф и др., N Engl J Med 363:411-422, 2010).

[0013] Опухолеассоциированный антиген может представлять собой патоген-опосредованный антиген, такой как вирус или другой патоген, который является основным драйвером процесса новообразований, например, белки из вируса папилломы человека (ВПЧ) (см.: Г.Г. Рентер и др., N Engl J Med, 361: 1838-1847, 2009).

[0014] Неоантигены представляют собой антигены, являющиеся результатом мутаций, которые присутствуют только в опухолевых клетках, а не в здоровых клетках (см.: Т.Н. Шумахер, Р.Д. Шрайбер, Science, 348: 69-74, 2015). Неоантигены могут быть созданы нуклеотидными полиморфизмами, которые приводят к изменениям неконсервативных аминокислот. Неоантигены могут быть созданы посредством вставок и/или делеций, которые могут привести к пептидным антигенам, содержащим вставку или делецию, или мутацию со сдвигом рамки. Неоантигены могут быть созданы введением стоп-кодона, который в своем новом контексте не распознается комплексом стоп-кодонов, в результате чего рибосома пропускает кодон и генерирует пептид, содержащий делецию одиночной аминокислоты. Неоантигены могут быть созданы посредством мутаций в сайтах сплайсинга, что приводит к некорректно сплайсированным транскриптам мРНК. Неоантигены могут быть созданы инверсиями и/или хромосомными транслокациями, которые приводят к слиянию пептидов.

[0015] Наконец, опухолеассоциированный антиген может содержать новые посттрансляционные модификации немутантных или мутантных пептидов, при этом, посттрансляционные модификации не присутствуют в здоровой ткани.

[0016] Таким образом, опухолеассоциированный антиген представляет собой любой антиген, продуцируемый опухолевой клеткой, который, при нацеливании посредством Т-клеточного ответа, в идеале приводит к значимой регрессии роста опухоли или предотвращает опухолеобразование с ограниченным эффектом, производимым в отношении здоровых, нераковых клеток.

Проблемы, существующие в области вакцинации

[0017] Для лечения определенных раковых заболеваний, предпочтительным иммунным ответом является CD8 Т-клеточный ответ (см.: Е. Трэн и др., N Engl J Med 375:2255-2262, 2016) и/или CD4 Т-клеточный ответ (и см.: Е. Трэн и др., Science 344: 641-645, 2014; и Н.Н. Хундер и др., N Engl J Med, 358:2698-2703, 2008), который распознает

опухолеассоциированный антиген, который преимущественно может быть устойчивым, высокоинтенсивным и высокофункциональным (высококачественным) (Л. Гаттинони и др., *Nature Medicine*, 17:1290-1297, 2011).

[0018] Одним из механизмов индуцирования Т-клеточного ответа на антигены, например, опухолеассоциированные антигены, у субъекта является вакцинация. В настоящее время изучается множество подходов к индукции CD8 и/или CD4 Т-клеточных ответов на опухолеассоциированные антигены, включая подходы на основе ДНК/РНК, вирусных векторов и пептидов (например, см.: Л.М. Кранц и др., *Nature* 534, 396-401, 2016; и С.Дж. Мельеф, С.Х. ван дер Бург, *Nat Rev Cancer* 8:351-360, 2008). Однако основная проблема в генерировании эффективного Т-клеточного иммунитета против раковых заболеваний заключается в том, что большинство современных подходов к вакцинам ограничены слабой иммуногенностью для выработки CD 8 Т-клеточного иммунитета и имеют ограниченную широту антигенного спектра ответов на большинство прогнозируемых неоантигенов (см.: С. Крейтер и др., *Nature* 520, 692-696, 2015).

[0019] Огромные усилия, направленные на индукцию противоопухолевого Т-клеточного иммунитета, были сосредоточены либо на применении синтетических пептидных антигенов, просто смешанных с различными иммуностимуляторами, и/либо носителей (адъювантов) (см.: С.Дж. Мельеф, С.Х. ван дер Бург, *Nat Rev Cancer* 8:351-360, 2008; и М.С. Бийкер и др., *Eur J Immunol* 38, 1033-1042, 2008) или RNA (см.: Кранц Л.М. и др. *Nature* 534(7607):396-401, 2016 и Крейтер С., и др. *Nature* 520(7549):692-696, 2015).

[0020] Однако основной проблемой в генерировании эффективного Т-клеточного иммунитета против раковых заболеваний является тот факт, что большинство современных подходов к вакцинам на основе пептидных антигенов или РНК были затруднительны из-за низкой интенсивности и ограниченной широты антигенного спектра ответов на опухолеассоциированные антигены, включая неоантигены. Например, что касается широты антигенного спектра, то современные общепринятые стандартные подходы к вакцинам на основе пептидов, основанные на пептидных антигенах (например, смешивание синтетических длинных пептидов из 25 аминокислот с адъювантом полиIC:LC) или РНК, индуцируют Т-клеточные ответы на менее, чем 10% прогнозируемых неоантигенов (см.: С. Крейтер и др., *Nature* 520, 692-696, 2015). Таким образом, необходимы усовершенствованные подходы к вакцинам, в частности, подходы к вакцинам на основе пептидов.

[0021] Полное объяснение низкой интенсивности и узкой широты антигенного спектра Т-клеточных ответов посредством современных технологий, применяемых для получения вакцин, еще предстоит получить, и, таким образом, продолжающая

существовать проблема заключается в том, что в настоящее время не достигнут консенсус относительно оптимальных параметров доставки пептидных антигенов для обеспечения надежного примирования Т-клеточного иммунитета для лечения и профилактики рака, а также для других применений, в том числе для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. Аналогичным образом, оптимальные параметры вакцин на основе пептидов для индуцирования супрессии и толерантности остаются неизвестными.

Современные проблемы, касающиеся Т-клеточных вакцин на основе пептидов

[0022] Основная проблема, существующая в разработке вакцин для лечения или профилактики инфекционных заболеваний и рака, заключается в том, что в настоящее время не достигнут консенсус относительно того, как лучше всего сконструировать вакцину на основе пептидов, чтобы она вырабатывала высокоинтенсивный Т-клеточный иммунитет против большинства антигенов. Аналогичным образом, не достигнут консенсус относительно того, как лучше всего сконструировать вакцину на основе пептидов для индуцирования иммунной толерантности или для сдвига иммунного ответа к безвредному типу ответа, с целью отделения от ответов, вызывающих аллергические реакции. Например, до сих пор ведутся серьезные дебаты относительно оптимальной длины пептидного антигена, физического формата доставки пептидного антигена (например, растворимый, по сравнению с состоящим из частиц) и типа природной стимуляции иммунитета (например, выбор адъюванта), необходимого для индукции оптимального Т-клеточного иммунитета для лечения или профилактики рака и инфекционных заболеваний, а также для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций. Действительно, влияние многих параметров вакцин на основе пептидов, в том числе влияние аминокислот, фланкирующих CD4 и CD8 Т-клеточные эпитопы, применяемых линкерных химических соединений, заряда и прочего на иммунные ответы остаются в значительной степени неизученными. Эта проблема особенно остро проявляется при рассмотрении вопроса о том, что индивидуализированные подходы к вакцинам должны быть разработаны как уникальные для каждого пациента и, следовательно, необходимы универсальные подходы к вакцинам на основе пептидов для надежной выработки иммунитета, в частности, Т-клеточного иммунитета, против специфических для пациента антигенов.

[0023] Еще одной серьезной проблемой, стоящей перед современными подходами к вакцинам на основе пептидов, является то, что они не учитывают широкий спектр возможных физических и химических характеристик пептидных антигенов. Например, индивидуализированные подходы к противораковым вакцинам потребуют, чтобы в

отношении каждого пациента был сгенерирован уникальный набор пептидных антигенов, который может иметь широкий спектр возможных физических и химических характеристик. Что касается аутоиммунных заболеваний, то в качестве причины патологии может быть идентифицировано несколько различных антигенов. Таким образом, индуцирующие толерантность вакцины должны содержать набор пептидных антигенов, которые являются уникальными для каждого пациента. Проблема заключается в том, что изменчивость пептидной антигенной композиции может приводить к образованию нескольких антигенов на основе пептидов, которые трудно или невозможно изготовить как нативный пептидный антиген, который, по оценкам, должен составлять, примерно, 10-30% антигенов на основе пептидов длиной, по меньшей мере, 25 аминокислот. Таким образом, на многие антигены нельзя нацеливаться с применением современных подходов к вакцинам, поскольку нативный пептидный антиген нельзя эффективно продуцировать или выделить после синтеза. Кроме того, изменчивость пептидной антигенной композиции, влияющая на заряд и растворимость, которая не контролируется в современных подходах к вакцинам на основе пептидов, может влиять на различные свойства состава вакцины, включая загрузку материалов пептида, и/или приводить к неблагоприятным взаимодействиям пептидного антигена либо с другими пептидными антигенами, либо с другими компонентами вакцины.

[0024] Таким образом, для преодоления ограничений, существующих в современных подходах к вакцинам на основе пептидов, необходимы новые композиции и способы изготовления вакцин на основе пептидов, которые (i) учитывают изменчивость физических и химических свойств пептидных антигенов в процессе изготовления, а также изменчивость состава вакцины для обеспечения оптимальной доставки пептидных антигенов для (ii) надежной индукции иммунного ответа, и в частности, Т-клеточного ответа у субъекта, на большинство антигенов. Такие вакцины и способы, которые учитывают изменчивость пептидного антигена и поэтому могут быть обобщены для любого пептидного антигена, были бы особенно полезны в области индивидуализированного лечения рака, при этом, характеристики пептидных антигенов, применяемых в индивидуализированной противораковой вакцине, могут отличаться у каждого отдельного пациента. Однако применимость вакцинных композиций на основе пептидов для любого пептидного антигена означает, что композиции также могут применяться и в других индивидуализированных иммунологических методах лечения, таких как, методы, применяемые для индуцирования толерантности или для модуляции иммунного ответа на аллергены для лечения аутоиммунных заболеваний и аллергических реакций, соответственно.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0025] Авторы настоящего изобретения разработали новые композиции и способы изготовления вакцин на основе пептидов, которые преодолевают, по меньшей мере, одно из ограничений современных подходов к вакцинам на основе пептидов. Новые вакцинные композиции на основе пептидов и способы их изготовления, раскрытые в настоящем документе, учитывают изменчивость физических и химических свойств пептидных антигенов и поэтому могут быть обобщены для любого пептидного антигена. Кроме того, новые вакцинные композиции на основе пептидов, раскрытые в настоящем документе, обеспечивают оптимальную доставку целого ряда различных пептидных антигенов для индукции иммунного ответа у субъекта.

[0026] Новые композиции, раскрытые в настоящем документе, относятся к иммуногенным композициям, содержащим пептидные антигенные конъюгаты. Пептидные антигенные конъюгаты содержат пептидный антиген (А), который сцеплен либо с гидрофобной молекулой (Н), которая образует частицы, либо с предварительно образованной Частицей (Р), либо непосредственно, либо опосредованно, посредством необязательного Линкера (L) и/или необязательного N- или C-концевого удлинения (В1 или В2), которое сцеплено либо с N-, либо с C-концом пептидного антигена, соответственно.

[0027] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, частицы, образованные пептидными антигенными конъюгатами, дополнительно содержат необязательную заряженную молекулу (С). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула сцеплена с пептидным антигенным конъюгатом для стабилизации частиц в водных условиях. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) предложена на отдельной молекуле и включена в частицы, образованные пептидными антигенными конъюгатами.

[0028] Добавление определенных N- и/или C-концевых удлинений (В1 и/или В2) и/или заряженных молекул (С) приводит к неожиданным улучшениям в изготовлении вакцин на основе пептидов путем твердофазного синтеза, а также к более удобной очистке за счет улучшенной растворимости в органическом растворителе, а также к неожиданным улучшениям в контроле за размером и стабильностью частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами. Эти композиции демонстрируют неожиданные улучшения в Т-клеточном иммунитете и клиренсе опухоли, в частности, в отношении интенсивности и широты Т-клеток, генерируемых против опухолеассоциированных антигенов.

[0029] Варианты осуществления настоящего изобретения включают пептидный антигенный конъюгат, содержащий: пептидный антиген (А); и либо гидрофобную молекулу (Н), либо частицу (Р), при этом, пептидный антиген (А) сцеплен либо с гидрофобной молекулой (Н), либо с частицей (Р), непосредственно или опосредованно, посредством N-концевого удлинения (В1), которое сцеплено с N-концом пептидного антигена (А), или посредством С-концевого удлинения (В2), которое сцеплено с С-концом пептидного антигена (А). Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают иммуногенную композицию, содержащую пептидные антигенные конъюгаты. Другие варианты осуществления настоящего изобретения включают способ лечения пациента, страдающего заболеванием, содержащий введение пациенту, страдающему этим заболеванием, пептидного антигенного конъюгата или иммуногенной композиции.

[0030] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, вакцина, применяемая для лечения рака, может применяться отдельно или в комбинации с другими методами иммунотерапии и лечения рака, включая, но этим не ограничиваясь, химиотерапию, ингибиторы контрольных точек, лучевую терапию и любую другую технологию, применяемую для борьбы с раком.

[0031] Таким образом, в настоящем документе также раскрыт способ лечения пациента, страдающего заболеванием, содержащий введение пациенту, страдающему этим заболеванием, пептидного антигенного конъюгата или иммуногенной композиции по настоящему изобретению.

[0032] Кроме того, в настоящем документе раскрыто применение пептидного антигенного конъюгата или иммуногенной композиции по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания.

[0033] Неожиданные результаты, раскрытые в настоящем документе, относятся к:

(i) Оптимальной длине пептидных антигенов (А), применяемых в противораковых вакцинах для обеспечения надежного примирования Т-клеточного иммунитета;

(ii) Применению удлинений последовательностей пептидного антигена, то есть, к N- или С-концевым удлинениям (В1 и/или В2) и/или к необязательным заряженным молекулами (С), которые облегчают изготовление вакцин на основе пептидов;

(iii) Тому, как характеристики гидрофобной молекулы (Н), содержащей пептидные антигенные конъюгаты, влияют на технологичность изготовления, а также на размер и стабильность частиц, и к тому, как эти параметры влияют на биологическую активность;

(iv) Композиции заряженных молекул (С) и к суммарному заряду пептидных антигенных конъюгатов, необходимых для индукции и стабилизации частиц оптимального размера для стимулирования Т-клеточного иммунитета;

(v) Композиции разлагаемых ферментами пептидных последовательностей, которая стимулирует эффективный процессинг минимальных эпитопов, доставляемых в контексте пептидного антигенного конъюгата; и/или

(vi) Тому, как активность и качественные характеристики Лигандов с адьювантными свойствами (например, агонисты PRR), доставляемых на пептидных антигенных конъюгатах, воздействуют на широту, интенсивность и качество Т-клеточных ответов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0034] **Фигура 1:** Нарисованная схема определенных вариантов осуществления пептидных антигенных конъюгатов

[0035] **Фигура 2:** Общая схема синтеза пептидных антигенных конъюгатов путем вступления в реакцию фрагмента пептидного антигена, содержащего предшественник линкера X1, несущий азид, с предшественником линкера X2, несущим DBCO, с образованием триазольного Линкера (L), который сцепляет пептидный антиген (A) с гидрофобной молекулой (H).

[0036] **Фигура 3:** Схема синтеза Соединения 1.

[0037] **Фигура 4:** Молекулярная масса и гидродинамическое поведение пептидных антигенов (A), и пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих пептидные антигены (A), состоящие либо из синтетических длинных пептидов (SLP или «LP»), либо из минимальных («Min») CD8 Т-клеточных эпитопов, полученных из линии опухолевых клеток MC38. Пептидные антигены (A), состоящие из LP, были сцеплены с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который либо оставался несцепленным, либо был сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей либо из DBCO-W₃, либо из DBCO-2BXu₃. Пептидные антигены (A), состоящие из LP, были сцеплены с удлинением (B1), которое было сцеплено с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который либо оставался несцепленным, либо был сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей либо из DBCO-W₃, либо из DBCO-2BXu₃.

[0038] **Фигура 5:** Влияние длины пептидного антигена (A), гидродинамического поведения и совместной доставки агониста TLR-7/8 (TLR-7/8a) на иммуногенность неоантигена на основе пептидов (Irgq). Мышей (N=5 на группу) иммунизировали различными иммуногенными композициями, содержащими пептидные антигены (A) на основе либо синтетического длинного пептида (LP, иногда именуемого «SLP»), либо

минимального CD8 Т-клеточного эпитопа (Min, иногда именуемого «ME») антигена Irgq, полученного из линии опухолевых клеток MC38, либо содержащими только пептидный антиген (A), добавленный в смесь с адъювантом TLR-7/8a; содержащими пептидный антиген (A), сцепленный с гидрофобной молекулой (H), W3 и добавленный в смесь с адъювантом TLR-7/8a; либо содержащими пептидный антиген (A), сцепленный с гидрофобной молекулой (H), совместно доставляющей адъювант TLR-7/8a, 2ВХу3. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а антигенспецифические CD8 Т-клеточные ответы (%IFN γ + от общего количества CD8 Т-клеток) оценивали относительно цельной крови в дни 0 и 25. Незаштрихованные кружки указывают, что пептидный антиген (A) был растворимым (то есть, не состоит из частиц), а заштрихованные кружки указывают, что мыши получали иммуногенную композицию пептидного антигена (A) на основе частиц.

[0039] **Фигура 6:** Влияние длины пептидного антигена (A), гидродинамического поведения и совместной доставки адъюванта TLR-7/8a на иммуногенность неоантигена на основе пептидов (Cpne1). Мышей (N=5 на группу) иммунизировали различными иммуногенными композициями, содержащими пептидные антигены (A) на основе либо синтетического длинного пептида (LP), либо минимального CD8 Т-клеточного эпитопа (Min) антигена Cpne1, полученного из линии опухолевых клеток MC38, либо содержащими только пептидный антиген (A), добавленный в смесь с адъювантом TLR-7/8a; содержащими пептидный антиген (A), сцепленный с гидрофобной молекулой (H), W₃ и добавленный в смесь с адъювантом TLR-7/8a; либо содержащими пептидный антиген (A), сцепленный с гидрофобной молекулой (H), совместно доставляющей адъювант TLR-7/8a, 2ВХу3. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а антигенспецифические CD8 Т-клеточные ответы (%IFN γ + от общего количества CD8 Т-клеток) оценивали относительно цельной крови в дни 0 и 25. Незаштрихованные кружки указывают, что пептидный антиген (A) был растворимым (то есть, не состоит из частиц), а заштрихованные кружки указывают, что мыши получали иммуногенную композицию пептидного антигена (A) на основе частиц.

[0040] **Фигура 7:** Молекулярная масса и гидродинамическое поведение пептидных антигенов (A), и пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих пептидные антигены (A), состоящих либо из синтетических длинных пептидов (SLP или «LP»), либо из минимальных («Min») CD8 Т-клеточных эпитопов, полученных из линии опухолевых клеток В16. Пептидные антигены (A), состоящие из LP, были сцеплены с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который либо оставался несцепленным, либо был сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей либо из DBCO-W₃, либо из DBCO-ВХу3. Пептидные антигены (A), состоящие из LP, были

сцеплены с удлинением (B1), которое было сцеплено с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который либо оставался несцепленным, либо был сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей либо из DBCO-W₃, либо из DBCO-2BXy₃.

[0041] **Фигура 8:** Влияние длины пептидного антигена (A) и активности TLR-7/8a, сцепленного с гидрофобной молекулой (H), на иммуногенность пептидных антигенных конъюгатов. Мышей (N=5 на группу) иммунизировали различными иммуногенными композициями, содержащими пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие либо синтетический длинный пептид (LP), минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп (Min), либо как SLP, так и Min пептидных антигенов (A), полученных из линии опухолевых клеток B16, сцепленных либо с гидрофобной молекулой (H) DBCO-2BXy₅, либо с DBCO-2B₅. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а антигенспецифические CD4 и CD8 Т-клеточные ответы (% IFNg⁺ от общего количества) оценивали относительно цельной крови в день 24. Гистограммы показывают сумму средних значений ответов по каждому пептидному антигену (M47, M44, M30, M25, M33, M27 и M08).

[0042] **Фигура 9:** Влияние активности TLR-7/8a, сцепленного с гидрофобной молекулой (H), на иммуногенность и широту Т-клеточных ответов, генерируемых против библиотеки пептидных неоантигенов. Мышей (N=5 на группу) иммунизировали иммуногенными композициями, содержащими 4 уникальных пептидных антигенных конъюгата, доставляющих различные минимальные CD8 Т-клеточные эпитопы, полученные из линии опухолевых клеток MC38 (общее количество эпитопов – 40), которые были сцеплены либо с гидрофобной молекулой (H) 2BXy₅, либо 2B₅. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а антигенспецифические CD8 Т-клеточные ответы (% IFNg⁺ от общего количества CD8 Т-клеток) оценивали относительно цельной крови в день 24. Показаны CD8 Т-клеточные ответы на каждый из 40 эпитопов. Доля пептидных антигенов (A), содержащих минимальные эпитопы CD8 Т-клеток, которые привели к CD8 Т-клеточным ответам, показана на секторной диаграмме.

[0043] **Фигура 10:** Влияние количества и дозы пептидных антигенов (A), а также количества сайтов вакцинации на иммуногенность неоантигенов на основе пептидов. Мышей (N=5 на группу) иммунизировали либо пептидными антигенными конъюгатами, содержащими одиночный минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп (Adpgk), либо пептидными антигенными конъюгатами, содержащими 4 других минимальных CD8 Т-клеточных эпитопа (Dpagt, Cpne1, Adpgk and Aatf). Доза пептидного антигена (A) и количество сайтов вакцинации отличались у разных групп. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а антигенспецифические CD8 Т-клеточные ответы (% IFNg⁺ от общего количества CD8 Т-клеток) оценивали относительно цельной крови в день 24.

[0044] **Фигура 11:** Схема пептидного антигенного конъюгата Формулы V.

[0045] **Фигура 12:** Влияние N- и C-концевых удлинений (B1 и B2) на активность *in vitro* для активации CD8 Т-клеток. Культуру спленоцитов с APC и неоантиген(Cpne1)-специфических CD8 Т-клеток, стимулировали *in vitro* пептидными антигенами (A) с минимальным CD8 Т-клеточным эпитопом (Cpne1), сцепленными с различными удлинениями (B1 и B2), и оценивали их на предмет способности стимулировать продуцирование IFN γ Cpne1-специфических CD8 Т-клеток.

[0046] **Фигура 13:** Пептидные антигенные конъюгаты, оцененные на Фигуре12. Пептидный антиген (A), состоящий из минимального эпитопа Cpne1 (Ser-Ser-Pro-Tyr-Leu-His-Tyr-Leu SEQ ID NO: 1), был сцеплен с любыми из двух или с обоими вместе – удлинениями B1 и/или B2, содержащими катепсин, и/или с иммунопротеасомальным сайтом расщепления, при этом, дополнительно, пептидный антиген (A) был сцеплен либо непосредственно, либо посредством удлинения B2 с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который был сцеплен с молекулой DBCO, которая была сцеплена с гидрофобной молекулой (H), 2ВХу₃.

[0047] **Фигура 14:** Влияние заряженной молекулы (C) и удлинений (B1 и/или B2) на иммуногенность *in vivo* пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих пептидный антиген (A), состоящий из минимального CD8 Т-клеточного эпитопа. Мышей (N=5 на группу) иммунизировали пептидными антигенными конъюгатами, содержащими различные заряженные молекулы (C) и удлинение(я) (B1 и/или B2) в дни 0 и 14, а антигенспецифические CD8 Т-клеточные ответы (%IFN γ ⁺ от общего количества CD8 Т-клеток) оценивали относительно цельной крови в день 10 (верхняя панель) и день 24 (нижняя панель).

[0048] **Фигура 15:** Влияние N- и C-концевых удлинений (B1 и B2) на активность *in vitro* для активации CD8 Т-клеток. Минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп (Adpgk) пептидного антигена (A) сцепляли с различными удлинениями (B1 и B2) и оценивали на предмет способности стимулировать продуцирование IFN γ из Adpgk-специфических CD8 Т-клеток.

[0049] **Фигура 16:** Эффективная концентрация при половине максимальной активности (EC50) показана для различных пептидных антигенных конъюгатов, оцененных на Фигуре 15. Более низкий уровень EC50 указывает на более высокую активность.

[0050] **Фигура 17:** Влияние N- и C-концевых удлинений (B1 и B2) на активность *in vitro* для активации CD8 Т-клеток и на активность *in vivo* для выработки новых CD8 Т-клеточных ответов. (A) Минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп (Adpgk) пептидного

антигена (А) сцепляли с различными удлинениями (В1 и В2) и оценивали на предмет способности стимулировать продуцирование IFN γ из Adp γ k-специфических CD8 Т-клеток (В). Способность пептидных антигенных конъюгатов с различными N- и С-концевыми удлинениями (В1 и В2), сцепленными с гидрофобной молекулой (Н) 2В₃W₂, оценивали на день 13 после однократной иммунизации.

[0051] **Фигура 18:** Влияние суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата и композиции гидрофобной молекулы на гидродинамическое поведение. Гидродинамическое поведение целого ряда различных пептидных антигенных конъюгатов Формулы V в концентрации 0,1 мг/мл или 0,5 мг/мл в PBS при pH 7,4 оценивали методом динамического рассеяния света. Отмечен суммарный заряд пептидных антигенных конъюгатов и количество или среднемассовый диаметр частиц. Мутность определяли путем измерения абсорбции раствора при 490 нм. Мутность > 0,04 указывает на агрегацию.

[0052] **Фигура 19:** Влияние суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата на гидродинамическое поведение. (А) Влияние суммарного заряда на гидродинамическое поведение целого ряда различных пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, суспендированных в концентрации 0,1 мг/мл или 0,5 мг/мл в PBS при pH 7,4, оценивали методом динамического рассеяния света. (В) Панель В Фигуры показывает актуальный список данных, показанных на панели (А) Фигуры. (С) Распределение частоты GRAVY и (D) распределение частоты заряда антигенов, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов. (Е) Размер частиц соответствующих LP неоантигенов (n=39), полученных в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a («SNP-7/8a») с суммарным зарядом либо +6, либо \geq +8. (F) Влияние суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата и общего среднего значения гидрофобности (GRAVY) на гидродинамическое поведение. Гидродинамическое поведение целого ряда различных пептидных антигенных конъюгатов, суспендированных в концентрации 0,1 мг/мл в PBS при pH 7,4, оценивали методом динамического рассеяния света. Отмечен среднечисловой диаметр частиц в качестве функции суммарного заряда и значения GRAVY.

[0053] **Фигура 20:** Влияние суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата и длины гидрофобной молекулы (Н), и композиции на гидродинамическое поведение пептидных антигенных конъюгатов Формулы V. Гидродинамическое поведение различных пептидных антигенных конъюгатов, суспендированных в концентрации 0,1 мг/мл в PBS при pH 7,4, с изменяющимся суммарным зарядом и композиции с гидрофобной молекулой, доставляющей модель минимального эпитопа (Min) на основе

неоантигена, Ala-Ser-Met-Thr-Asn-Met-Glu-Leu-Met-Ser-Ser (SEQ ID NO: 2) («Adpgk»), оценивали по динамическому рассеянию света. (А) Отмечен среднечисловой диаметр частиц в качестве функции суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата для 4 различных гидрофобных молекул (2B₂W₈, 2BXy₅, 2B₅, W₅). (В) Данные о распределении по размерам показаны для пептидного антигенного конъюгата с суммарным зарядом +6, который самособирается в наночастицы («Min-SNP-7/8a»), и для конъюгированного пептидного антигена, доставляемого тем же пептидным антигеном (А), но с суммарным зарядом 0, который собирается в микрочастицы/агрегаты («Min-MP-7/8a»).

[0054] **Фигура 21:** Влияние суммарного заряда на гидродинамическое поведение пептидного антигенного конъюгата Формулы V, доставляющего гидрофобный пептидный антиген. (А) Общее среднее значение графика распределения гидрофобности (GRAVY) 1,377 LP неоантигенов среди 4 моделей опухолей мышей (B16.F10, MC38, 3123 и Panc02). (В) Наиболее гидрофобный неоантиген LP, идентифицированный на панели (А) Фигуры (красный заштрихованный круг) получали в виде LP и Min, доставляемых в качестве пептидного антигенного конъюгата Формулы V, который самособирается в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a («SNP-7/8a»), и оценивали на предмет влияния суммарного заряда (абсолютное значение) на размер частиц. Размер частиц оценивали методом динамического рассеяния света посредством пептидного антигенного конъюгата, суспендированного в концентрации 0,5 мг/мл в PBS при pH 7,4. Отмечен среднемассовый диаметр частиц в качестве функции суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата.

[0055] **Фигура 22:** Влияние композиции с заряженной молекулой (С или «С-блок») и гидрофобной молекулой (Н или «Н-блок») на иммуногенность для генерирования CD8 Т-клеточных ответов на неоантигенный минимальный эпитоп, Adpgk, доставляемый в виде пептидного антигенного конъюгата Формулы V. (А-Е) Пептидные антигенные конъюгаты с композицией, содержащей молекулы с изменяющимся зарядом (либо на основе поли(K), поли(R), поли(D), либо при их отсутствии) и с композицией с гидрофобной молекулой (либо на основе W₅, 2BXy₃W₂, либо на основе 2B₃W₂), доставляющей минимальный эпитоп, Adpgk, вводили мышам (N=3 на группу на дозу) в различных дозах в дни 0, 14 и 28, и оценивали неоантиген(Adpgk)-специфические CD8 Т-клеточные ответы относительно цельной крови в последовательные моменты времени.

[0056] **Фигура 23:** Влияние композиции с заряженной молекулой (С или «С-блок») на иммуногенность для генерирования CD8 Т-клеточных ответов на неоантигенный минимальный эпитоп, Adpgk, доставляемый в виде пептидного антигенного конъюгата Формулы V. (А) Пептидные антигенные конъюгаты с С-блоком на основе либо поли(K),

поли(D), либо PEG (полиэтиленгликоль), доставляющие минимальный эпитоп, Adpgk, вводили мышам (N=3 на группу на дозу) в различных дозах в дни 0, 14 и 28, и оценивали неоантиген(Adpgk)-специфические CD8 Т-клеточные ответы относительно цельной крови в день 36 (B).

[0057] **Фигура 24:** Влияние пути введения на CD8 Т-клеточные ответы, генерируемые пептидными антигенными конъюгатами («SNP-7/8 а»). Пептидный антигенный конъюгат с заряженной молекулой (С) поли(К) и с гидрофобной молекулой (Н) 2В₃W₂, доставляющий неоантигенный минимальный эпитоп (Adpgk = Ala-Ser-Met-Thr-Asn-Met-Glu-Leu-Met (SEQ ID NO: 77)), вводили мышам в день 0, 14 и 28, а неоантиген(Adpgk)-специфические CD8 Т-клеточные ответы оценивали относительно цельной крови в день 36.

[0058] **Фигура 25:** Влияние композиции гидрофобной молекулы (Н) и гидродинамического поведения пептидного антигенного конъюгата на CD4 и CD8 Т-клеточные ответы. Мышей (N=5 на группу) иммунизировали иммуногенными композициями, содержащими минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп и CD4 Т-клеточный эпитоп (эпитоп PADRE) либо в виде микрочастиц (MP) (> 500 нм в диаметре), либо в виде мицелл наночастиц (NP) (< 200 нм в диаметре), несущих изменяющиеся количества и активность агонистов TLR-7/8. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а антиген(Adpgk)-специфические (А) CD8 Т-клеточные ответы (%IFNg⁺ от общего количества CD8 Т-клеток) и (В) PADRE-специфические CD4 Т-клеточные ответы оценивали относительно цельной крови в день 24.

[0059] **Фигура 26:** Нарисованная химическая схема пептидных антигенных конъюгатов с заряженной молекулой (С) поли(К) и с гидрофобной молекулой (Н) на основе 2В₃W₂, доставляющий либо LP, либо Min эпитопные формы пептидных антигенов.

[0060] **Фигура 27:** Доставка пептидных неоантигенов в виде частиц усиливает CD8 Т-клеточные ответы, направленные на пептидный антиген (А) на основе неоантигенов. (А) Мутность различных неоантигенов в виде нативных LP, LP, сцепленных с гидрофобной молекулой (2В₃W₂), которые скапливаются в микрочастицы («MP-7/8а»), или в виде LP, синтезированных в виде пептидного антигенного конъюгата Формулы V, который самособирается в наночастицы («SNP-7/8а»). Мутность > 0,05 OD указывает на агрегацию. (В-Е) Мышей иммунизировали нативными LP, добавленными в смесь с полиICLC, или LP, доставляемыми в виде MP-7/8а или SNP-7/8а в дни 0 и 14, и CD8 Т-клеточные ответы оценивали относительно цельной крови в день 28. Данные по логарифмической шкале отмечены как среднее геометрическое значение с цветовым показателем 95% CI (доверительный интервал); Сравнение нескольких групп на предмет

статистической значимости проводилось с применением однонаправленного или двунаправленного ANOVA (дисперсионный анализ); ns = не значимо; *, $p = 0,05$; **, $p = 0,01$.

[0061] **Фигура 28:** Механизм учета улучшенной иммуногенности пептидных антигенных конъюгатов, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a). (A-C) Минимальный эпитоп, Adp_{gk}, флуоресцентно метили и затем вводили подкожно в подушечки задних лапок мышей в день 0 либо в виде растворимого пептида, добавленного в смесь с низкомолекулярным TLR-7/8a (7/8a), растворимого пептида, добавленного в смесь с MP-7/8a, либо ковалентно сцепленным с MP-7/8a, либо с SNP-7/8a. Затем лимфатические узлы (N=5 на момент времени на группу), дренирующие сайт иммунизации, собирали в последовательные моменты времени и оценивали на предмет количества пептидов (E), поглощения пептидов APC (антигенпрезентирующие клетки) лимфатических узлов на клеточной основе (F) и продуцирования цитокина IL-12p40 (G). Данные отмечены со средним значением \pm SEM (Стандартная ошибка среднего значения). Сравнение нескольких групп на предмет статистической значимости проводилось с применением однонаправленной или двунаправленной ANOVA; ns = не значимо; *, $p = 0,05$; **, $p = 0,01$.

[0062] **Фигура 29:** Иммуногенность неоантигенов на основе пептидов, доставляемых либо в виде LP, либо Min в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a). Различные неоантигены на основе пептидов получали либо в виде LP, либо Min, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов, при этом, заряженная молекула (C) представляет собой поли(лизин), а гидрофобная молекула (H) представляет собой $2B_3W_2$, которая самособирается в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (именуемый как «SNP-7/8a»). Мышей (N=7 на группу) иммунизировали либо LP, либо Min формой неоантигенов на основе пептидов, сцепленных с SNP-7/8a в дни 0 и 14. (A) CD8 T-клеточные ответы и (B) CD4 T-клеточные ответы оценивали относительно цельной крови в день 28. Данные по логарифмической шкале отмечены как среднее геометрическое значение с цветовым показателем 95% CI (доверительный интервал); Сравнение нескольких групп на предмет статистической значимости проводилось с применением однонаправленного или двунаправленного ANOVA (дисперсионный анализ); ns = не значимо; *, $p = 0,05$; **, $p = 0,01$.

[0063] **Фигура 30:** Иммуногенность неоантигенов на основе пептидов, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов на основе LP Формулы V, при этом, заряженная молекула (C) представляет собой поли(лизин), а гидрофобная молекула

(H) представляет собой $2B_3W_2$, которая самособирается в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (именуемый как «SNP-7/8a»), по сравнению с нативными LP, добавленными в смесь с полиICLC. Мышей иммунизировали в дни 0 и 14, а CD8 Т-клеточные ответы оценивали относительно цельной крови в день 28.

[0064] **Фигура 31:** Взаимосвязь между иммуногенностью и прогнозируемой аффинностью связывания. (A) Иммуногенность минимальных эпитопов (N=179) для генерирования CD8 Т-клеточных ответов при доставке в виде пептидных антигенных конъюгатов, при этом, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер-TLR-7/8a, построенный в виде графика зависимости от прогнозируемой аффинности связывания с применением алгоритма достижения консенсуса Базы данных по иммунным эпитопам (IEDB). (B) Зависимости количества верно классифицированных положительных объектов от количества неверно классифицированных отрицательных объектов (ROC-кривые) в отношении чувствительности и специфичности различных алгоритмов прогнозирования связывания МНС-I, основанных на пороге отсечения консенсусной оценки 0,5 или 500 нм в качестве связующего.

[0065] **Фигура 32:** Собственные антигены и неоантигены, доставляемые в виде пептидных антигенов (A) на пептидных антигенных конъюгатах Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a), вырабатывают опосредованный CD8 и CD4 Т-клетками клиренс развившейся меланомы. Мышей с развившимися опухолями B16.F10 лечили посредством PD1 и/либо посредством SNP-7/8a, доставляющего Adpгk LP (CD8 Т-клеточный эпитоп не присутствует в B16.F10), собственного антигена, Trp1, минимального CD8 Т-клеточного эпитопа, либо посредством неоантигена, M30 LP которого имеет CD4 Т-клеточный эпитоп, в дни 2, 9 и 16.

[0066] **Фигура 33:** Неоантигены, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a), вводимые подкожным и внутривенным путями, вырабатывают устойчивый опосредованный CD8 Т-клетками клиренс развившейся опухоли. Мышей с развившимися опухолями MC38 вакцинировали посредством Adpгk LP-SNP-7/8a либо подкожным, либо внутривенным путями в дни 9 и 16, и затем оценивали объем опухоли в последовательные моменты времени.

[0067] **Фигура 34:** Неоантигены, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a), вырабатывают опосредованный CD8 Т-клетками клиренс развившейся меланомы. Мышей с развившимися опухолями B16.F10 лечили

посредством PDL1 и либо посредством SNP-7/8a, доставляющего Med12 (MC38 неоантиген с CD8 Т-клеточным эпитопом), собственного антигена, Trp1 (B16 собственный антиген с CD8 Т-клеточным эпитопом), либо посредством M39 (B16 неоантиген с CD8 Т-клеточным эпитопом) в дни 1, 8 и 15. (А) Контролировали рост опухоли и (В) оценивали CD8 Т-клеточные ответы в день 17.

[0068] **Фигура 35:** Вирусные (ВПЧ) антигены, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a), вырабатывают опосредованное CD8 Т-клетками отторжение ВПЧ+ опухоль. (А и В) Мышей иммунизировали различными пептидными минимальными эпитопами Е6 и Е7 (min), полученными из ВПЧ, доставляемыми в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, при этом, заряженная молекула (С) представляет собой поли(лизин), а гидрофобная молекула (Н) представляет собой 2B₃W₂, которая самособирается в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (именуемый как «SNP-7/8a») в дни 0 и 14. (А) CD8 Т-клеточные ответы оценивали в день 28, и мышей заражали ВПЧ+ линия раковых клеток (ТС1), и (В) оценивали объем опухоли в день 14 после заражения.

[0069] **Фигура 36:** Размер частиц и стабильность мультиантигенных частиц. (А) Неоантигенные LP в виде пептидных антигенов (А) (А1-А9) с диапазоном заряда (от -6 до +6) и гидропатию (GRAVY от -2 до +2) (В) синтезировали в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, при этом, заряженная молекула (С) представляет собой поли(К), В1 представляет собой VR, В2 представляет собой SPVZ, предшественник линкера X1 представляет собой азидо-лизин («X», именуемый также К'), а гидрофобная молекула (Н) представляет собой 2B₃W₂, которая самособирается в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a). Пептидные антигенные конъюгаты, суспендированные в концентрации 0,5 мг/мл в PBS при pH 7,4 и оцененные на предмет мутности (OD 490 нм) и размер частиц (диаметр, нм). (С) Мультиантигенные частицы, содержащие несколько различных пептидных антигенных конъюгатов (А1-А9), смешивали друг с другом в различных соотношениях в растворе DMSO (сценарии 1-7) и затем суспендировали в концентрации 0,5 мг/мл в PBS при pH 7,4, и оценивали на предмет мутности (OD 490 нм) и размер частиц (диаметр, нм). В таблице предложено процентное содержание каждого пептидного антигенного конъюгата, содержащего мультиантигенные частицы, для каждого сценария.

[0070] **Фигура 37:** Показаны Т-клеточные ответы, индуцированные пептидными антигенными конъюгатами Формулы V, доставляющими опухолеассоциированные

собственные антигены, антиген инфекционного заболевания (ВИЧ) и чужеродный антиген.

[0071] **Фигура 38:** Показаны размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных заряженных молекул (С) или различных гидрофобных молекул (Н) на основе поли(аминокислот) Формулы II, сцепленных с адьювантами Формулы III.

[0072] **Фигура 39:** Показаны размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных гидрофобных молекул (Н) на основе поли(аминокислот) Формулы II, сцепленных с различными агонистами PRR.

[0073] **Фигура 40:** Показаны размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, при этом, пептидный антиген (А) сцеплен с гидрофобной молекулой (Н) с применением различных линкерных химических соединений (амидоэфир и тиоэфир).

[0074] **Фигура 41:** Показаны размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных гидрофобных молекул (Н) на основе жирных кислот, липидов и холестерина.

[0075] **Фигура 42:** Показаны размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных гидрофобных молекул (Н) на основе диблок-сополимеров типа А-В.

[0076] **Фигура 43:** Показаны размер частиц и стабильность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V на основе пептидных антигенов (А), сцепленных с предварительно образованными Частицами (Р).

[0077] **Фигура 44:** Показаны размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих аутоантигены, применяемые для индуцирования толерантности.

[0078] **Фигура 45:** показывает размер частиц и биологическую активность частиц, состоящих из А-Н + С-Н или А-Н(С) (Формула VI).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0079] Подробное описание терминов и способов приведено ниже для внесения большей ясности в отношении соединений, композиций, способов и их применения(й) для индуцирования иммунного ответа у субъекта по настоящему изобретению в качестве методологического материала для специалистов обычной квалификации в данной области техники. Терминология настоящего изобретения понимается как применяемая с целью предложения лучшего описания конкретных вариантов осуществления настоящего

изобретения, и она не должна рассматриваться как ограничивающая настоящее изобретение.

[0080] **Примерно:** В контексте настоящего изобретения, «примерно» означает плюс или минус 5% от установленного количества. Например, «примерно, 10» относится к 9,5-10,5. Соотношение «примерно, 5: 1» относится к соотношению от 4,75: 1 до 5,25: 1.

[0081] **Адъювант:** Любой материал, добавляемый к вакцинам для усиления или модификации иммуногенности антигена. Адъюванты могут представлять собой системы доставки, такие как, частицы на основе неорганических солей (например, гидроксида алюминия или фосфатных солей, именуемых квасцами), эмульсии вода-в-масле или масло-в-воде или полимерные частицы (например, PLGA), в которых антиген просто добавлен в смесь или адсорбирован, включен внутрь или сцеплен, опосредованно или непосредственно, посредством ковалентных взаимодействий. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, адъюванты могут представлять собой химически определяемые молекулы, которые связываются с установленными рецепторами и индуцируют нисходящие сигнальные пути, включая агонистов паттерн-распознающих рецепторов (PRR), таких как, синтетические агонисты или агонисты природного происхождения Толл-подобных рецепторов (TLR), стимулятор генов интерферона (STING), нуклеотид-связывающие олигомеризационные доменоподобные рецепторы (NLR), индуцируемые ретиноевой кислотой ген-I-подобные рецепторы (RLR) или рецепторы лектинов C-типа (CLR), а также биологические молекулы («биологический адъювант»), такие как, IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L, 4-1BBL. Низкомолекулярные аналоги нуклеотидных оснований, такие как, гидроксиденин и имидазохинолины, которые связываются с Толл-подобными рецепторами-7 (TLR-7) и TLR-7/8A, соответственно, а также агонисты TLR-2/6, TLR-4, STING и NOD применяются в настоящем изобретении в качестве примерных агонистов PRR. Человеку обычной квалификации в данной области техники известны адъюванты (см.: Перри и др., Int J Pharm 364:272-280, 2008 и Брито и др., Journal of Controlled Release, 190C:563-579, 2014). В целом, любой агонист PRR или биологический адъювант, перечисленные в настоящем документе, может быть соединен с пептидным антигенным конъюгатом по настоящему изобретению посредством любых подходящих механизмов.

[0082] **Введение:** Для предложения субъекту или для обеспечения его агентом, например, иммуногенной композицией, содержащей пептидный антигенный конъюгат, как описано в настоящем документе, любым эффективным путем.

[0083] Примерные пути введения включают, но этим не ограничиваются, пероральный, инъекционный (такой как, подкожный, внутримышечный, внутрикожный,

внутрибрюшинный и внутривенный), трансдермальный (например, местный), интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути.

[0084] «**Введение**» и «**применение**» соединения следует понимать как предложение соединения, пролекарства соединения или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. Соединение или композиция могут вводиться субъекту другим лицом, или субъект может вводить ее самостоятельно.

[0085] **Антигенпрезентирующая клетка (АРС):** Любая клетка, презентующая антиген, связанный с молекулами МНС класса I или класса II, Т-клеткам, включая, но этим не ограничиваясь, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, В-клетки, Т-клетки и клетки Лангерганса.

[0086] **Антиген:** Любая молекула, содержащая эпитоп, который связывается с Т-клеточным или В-клеточным рецептором и может стимулировать иммунный ответ, в частности, В-клеточный ответ и/или Т-клеточный ответ у субъекта. Эпитопы могут состоять из пептидов, гликопептидов, липидов или любых подходящих молекул, содержащих эпитоп, который может взаимодействовать с компонентами специфических В-клеточных и Т-клеточных белков. Такие взаимодействия могут генерировать ответ со стороны иммунной клетки. «**Эпитоп**» относится к области пептидного антигена, с которой взаимодействуют В-клеточные и/или Т-клеточные белки, то есть, В-клеточные рецепторы и Т-клеточные рецепторы.

[0087] Антигены, применяемые в вариантах осуществления настоящего изобретения, могут быть выбраны из патогенов, раковых клеток, аутоантигенов или аллергенов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген может представлять собой антиген на основе пептидов, который может включать область полипептида или белка из патогена (такого как, вирус, бактерии или грибки) или интересующей ткани (такой как, раковая клетка). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген может представлять собой цельный белок или гликопротеин, производное патогена, или пептидный или гликопептидный фрагмент белка или гликопротеина. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген может представлять собой белок или пептидные фрагменты белка, который экспрессируется преимущественно опухолевой тканью (но не здоровой тканью) и является опухолеассоциированным антигеном. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген представляет собой белок или пептид, который ассоциирован с аутоиммунным заболеванием. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген представляет собой белок или гликопротеин, который ассоциирован с аллергическими реакциями.

[0088] Многие такие антигены могут применяться в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, и в настоящем документе они обсуждаются более подробно.

[0089] **Ароматические соединения:** Ароматические соединения представляют собой ненасыщенные циклические кольца с нечетным количеством пар Пи-орбитальных электронов, которые делокализованы между атомами углерода или азота, образующими кольцо. Ароматические аминокислоты включают аминокислоты, у которых боковая цепь содержит ароматическую группу, такую как, фенилаланин, тирозин или триптофан. Бензол, 6-углеродное кольцо, содержащее три двойные связи, представляет собой прототип ароматического соединения. Фенилаланин (Phe) и триптофан (Trp) являются прототипами ароматических аминокислот. Арил может относиться к ароматическому заместителю, а ариламин может относиться к ароматической группе, содержащей амин. Примером ароматического амина является анилин. Ароматические гетероциклы относятся к ароматическим кольцам, содержащим циклические кольцевые структуры, содержащие углерод и другой атом, такой как, азот, кислород или сера. Нуклеотидные основания, такие как, аденин и цитозин, являются примерными ароматическими гетероциклами.

[0090] **Биосовместимый:** Материалы считаются биосовместимыми, если они оказывают минимальное деструктивное воздействие или вызывают ответ организма при контакте с биологическими жидкостями, клетками или тканями.

[0091] Биосовместимая группа может содержать химические вещества, фрагменты, в том числе из следующих классов: алифатические, алициклические, гетероалифатические, гетероалициклические, арильные или гетероарильные. Однако, в зависимости от молекулярной композиции, такие фрагменты не всегда являются биосовместимыми.

[0092] Термин «**биосовместимость**», в качестве альтернативы, понимается как означающий либо минимальные взаимодействия с распознающими белками и/или другими компонентами биологических систем (например, с антителами природного происхождения, белками клеток, включая гликопротеины, или с клетками); либо вещества и функциональные группы, специально предназначенные для того, чтобы вызывать взаимодействия с компонентами биологических систем (например, с лекарственными препаратами и пролекарствами), таким образом, результат взаимодействий не является по существу негативным или деструктивным.

[0093] **CD4:** Кластер дифференцировки 4, поверхностный гликопротеин, взаимодействующий с молекулами MHC класса

II, присутствующими на поверхности других клеток. Подмножество Т-клеток экспрессирует CD4, и эти клетки обычно именуют Т-хелперами.

[0094] **CD8:** Кластер дифференцировки 8, поверхностный гликопротеин, взаимодействующий с молекулами МНС класса I, присутствующими на поверхности других клеток. Подмножество Т-клеток экспрессирует CD8, и эти клетки обычно именуют цитотоксическими Т-клетками или киллерными Т-клетками.

[0095] **Заряд:** Физическое свойство вещества, влияющее на его взаимодействия с другими атомами и молекулами, включая растворенные вещества и растворители. Заряженное вещество испытывает воздействие электростатической силы от других типов заряженного вещества, а также от молекул, не содержащих полного целночисленного значения заряда, таких как, полярные молекулы. Две заряженные молекулы с одинаковым зарядом отталкиваются друг от друга, в то время как две заряженные молекулы с разным зарядом притягиваются друг к другу. Заряд зачастую описывается в положительных или отрицательных целочисленных единицах.

[0096] **Заряженная молекула (С):** Заряженная молекула (С) относится к любой молекуле, которая имеет, по меньшей мере, одну функциональную группу, заряженную положительно или отрицательно. Функциональные группы, содержащие заряженную молекулу, могут представлять собой частичные или полные целочисленные значения заряда. Заряженная молекула может представлять собой молекулу с единственной заряженной функциональной группой или с несколькими заряженными функциональными группами. Функциональные группы могут быть постоянно заряженными, или функциональные группы, содержащие заряженную молекулу, могут иметь заряд в зависимости от рН. Заряженная молекула может состоять из положительно заряженных функциональных групп, отрицательно заряженных функциональных групп или как из положительно, так и отрицательно заряженных функциональных групп. Суммарный заряд заряженной молекулы может быть положительным, отрицательным или нейтральным. Заряд молекулы может быть легко оценен на основе молекулярной структуры Льюиса и общепринятых способов, известных специалистам в данной области техники. Заряд может быть вызван индуктивными эффектами, например, связанные вместе атомы, имеющие различия в электронной аффинности, могут привести к полярной ковалентной связи, приводящей к атому с частичным отрицательным зарядом и к атому с частичным положительным зарядом. Например, азот, связанный с водородом, приводит к частичному отрицательному заряду на азоте и частичному положительному заряду на атоме водорода. В качестве альтернативы, атом может считаться имеющим полное целочисленное значение заряда, когда количество электронов, присущих этому атому,

меньше или равно атомному номеру этого атома. Заряд функциональной группы определяется суммированием заряда каждого атома, содержащего функциональную группу. Суммарный заряд заряженной молекулы (С) определяется суммированием заряда каждого атома, содержащего молекулу. Специалистам в данной области техники известен процесс оценки заряда молекулы или отдельных функциональных групп путем суммирования формального заряда каждого атома в молекуле или функциональной группе, соответственно.

[0097] Заряженные молекулы (С) могут содержать отрицательно заряженные функциональные группы, такие как, группы, которые встречаются в виде конъюгатного основания кислоты при физиологической норме рН (например, функциональные группы с рКа – менее, примерно, 6,5), например, при рН, составляющем, примерно, 7,4. Они включают, но этим не ограничиваются, молекулы, несущие карбоксилаты, сульфаты, фосфаты, фосфорамидаты и фосфонаты. Заряженные молекулы могут содержать положительно заряженные функциональные группы, такие как, группы, которые встречаются в виде конъюгатной кислоты основания при физиологической норме рН (например, функциональные группы, при этом, рКа конъюгатной кислоты основания – больше, примерно, 8,5). Они включают, но этим не ограничиваются, молекулы, несущие первичные, вторичные и третичные амины, а также аммоний, гуанидиний. Заряженные молекулы могут содержать функциональные группы с зарядом, не зависящим от рН, включая функциональные группы четвертичного аммония, фосфония и сульфония. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула представляет собой поли(аминокислоту), содержащую отрицательно или положительно заряженные аминокислоты, или как отрицательно, так и положительно заряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, отрицательно заряженная аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, положительно заряженная аминокислота представляет собой лизин или аргинин. Специалистам в данной области техники понятно, что возможно множество таких вариантов осуществления настоящего изобретения.

[0098] **Клик-химическая реакция:** Может относиться к биоортогональной реакции, которая соединяет два соединения вместе в мягких условиях при высокоэффективной реакции, которая генерирует минимальные, биосовместимые и/или безвредные побочные продукты. Примером клик-химической реакции, применяемой в настоящем изобретении, является реакция азидной группы, предложенной на предшественнике линкера X1, с алкином, предложенным на предшественнике линкера X2,

который образует триазольный Линкер (L) посредством стимулированного штаммом [3+2] азид-алкинового циклоприсоединения.

[0099] **Эффективное количество:** Количество, необходимое для того, чтобы индуцировать желаемую реакцию. Например, количество агента, либо одного, либо с, по меньшей мере, одним дополнительным агентом, необходимое для индукции иммунного ответа, например, на пептидный антигенный конъюгат.

[00100] **Удлинение(я):** Термин удлинение применяется в настоящем документе для описания молекул, сцепленных с N- или C-концом пептидного антигена (A), которые состоят из аминокислот, неприродных аминокислот; гидрофильных мономеров этиленоксидов (то есть, PEG); гидрофобных алкановых цепей; или их комбинаций и функционируют для модуляции скорости деградации пептидного антигена (A). Удлинения, сцепленные с N-концом пептидного антигена, именуется B1, а удлинения, сцепленные с C-концом пептидного антигена, именуется B2. Удлинения (B1 и B2), в основном, функционируют для контроля скорости деградации пептидного антигена, но они могут выполнять и любую, по меньшей мере, одну дополнительную функцию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) могут быть сцеплены с другой молекулой, такой как, заряженная молекула (C) или гидрофобная молекула (H), и функционировать в качестве линкера, а также контролировать скорость высвобождения пептидного антигена (A) из другой молекулы. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) функционируют для обеспечения расстояния, то есть, пространства, между любыми двумя гетерологичными молекулами. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) функционируют для придания пептидному антигенному конъюгату гидрофобных или гидрофильных свойств. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, композиции удлинений (B1 и/или B2), применяемых в качестве линкера, могут быть выбраны для придания жесткости или гибкости между пептидным антигеном (A) и гетерологичной молекулой. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) представляют собой пептидные последовательности, выбранные для распознавания и гидролиза ферментами, такими как, протеазы. Следует отметить, что удлинения B1 и B2 могут также именоваться линкерами B1 и B2 или B₁ и B₂, соответственно. Специфические композиции удлинений, которые подходили бы практического применения настоящего изобретения, описаны повсеместно.

[00101] **Привитой полимер:** Может быть описан как полимер, возникающий в результате сцепления полимера одной композиции с боковыми цепями второго полимера

другой композиции. Первый полимер, сцепленный посредством сомономеров со вторым полимером, представляет собой граф-сополимер. Первый полимер, сцепленный посредством концевой группы со вторым полимером, может быть описан как блок-полимер (например, диблок типа А-В) или привитой полимер с концевой группой.

[00102] **Индекс гидропатии / значение GRAVY:** Представляет собой число, представляющее гидрофобные или гидрофильные характеристики аминокислоты. Существует множество шкал, которые могут применяться для описания относительных гидрофобных и гидрофильных характеристик аминокислот, содержащих пептиды. В настоящем изобретении, Шкалу гидропатии Кайта и Дулиттла (Kyte J, Doolittle RF, J. Mol. Biol, 157: 105-32, 1983) применяют для вычисления общего среднего значения гидропатии (GRAVY), иногда именуемого оценкой GRAVY, последовательности аминокислот, содержащих пептидные антигенные конъюгаты, включая пептидный антиген (А), N- и C-концевые необязательные удлинения на основе пептидов (В1 и В2) и необязательную заряженную молекулу (С). Значение GRAVY пептида представляет собой сумму значений Гидропатии всех аминокислот, содержащих пептид, разделенную на длину (то есть, количество аминокислот) пептида. Значение GRAVY представляет собой относительное значение. Чем больше значение GRAVY, тем более гидрофобной считается пептидная последовательность, в тоже время, чем ниже значение GRAVY, тем более гидрофильной считается пептидная последовательность.

[00103] **Гидрофильный:** Относится к тенденции материала свободно диспергироваться в водных средах. Материал считается гидрофильным, если он предпочтительно взаимодействует с другим гидрофильным материалом и избегает взаимодействия с гидрофобным материалом. В некоторых случаях, гидрофильность может применяться в качестве относительного термина, например, одна и та же молекула могла бы быть описана как гидрофильная или независимо от того, с чем ее сравнивают. Гидрофильные молекулы зачастую полярны и/или заряжены, и они имеют хорошую растворимость в воде, например, они растворимы вплоть до концентрации, по меньшей мере, 0,1 мг/мл.

[00104] **Гидрофобный:** Относится к тенденции материала избегать контакта с водой. Материал считается гидрофобным, если он, предпочтительно, взаимодействует с другим гидрофобным материалом и избегает взаимодействия с гидрофильным материалом. Гидрофобность является относительным термином; одна и та же молекула могла бы быть описана как гидрофобная или независимо от того, с чем ее сравнивают. Гидрофобные молекулы зачастую неполярны и не заряжены, и они имеют плохую

растворимость в воде, например, они нерастворимы вплоть до концентрации 0,1 мг/мл или менее.

[00105] **Гидрофобный лиганд:** Представляет собой молекулу, которая связывается с биологическими рецепторами и имеет гидрофобные характеристики. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные лиганды расположены вдоль полимерного остова, тем самым придавая гидрофобные свойства полимеру, с которым он сцеплен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобный лиганд представляет собой агонист паттерн-распознающего рецептора, который имеет ограниченную растворимость в воде и поэтому может быть описан как гидрофобный. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобный лиганд представляет собой агонист TLR-7 или TLR-7/8, такой как, имидазохинолин.

[00106] **Гидрофобная молекула (Н):** В настоящем изобретении, термин «гидрофобная молекула» (Н) применяется в качестве общего термина для описания молекулы с ограниченной растворимостью в воде или амфифильными характеристиками, которая может быть сцеплена с пептидными антигенами, что приводит к образованию пептидного антигенного конъюгата, который образует частицы в водных условиях. Гидрофобная молекула (Н) в настоящем контексте стимулирует скопление частиц из-за ее плохой растворимости или тенденции собираться в частицы в водных условиях при определенных диапазонах температур и рН.

[00107] Гидрофобные молекулы (Н), описанные в настоящем документе, включают амфифильные молекулы, которые могут образовывать надмолекулярные структуры, такие как, мицеллы или образующие два слоя ламелярные или мультислойные структуры (например, липосомы или полимерсомы), а также соединения, которые полностью нерастворимы и образуют только агрегаты. Гидрофобные характеристики молекулы могут быть чувствительными к температуре и/или рН. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер, который растворим в воде при низких температурах, но нерастворим или образует мицеллы при температурах выше, например, 20° С, таких как, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40°С. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер, который растворим в воде при низком рН, например, при рН ниже 6,5, но нерастворим, например, при рН выше 6,5. Примеры гидрофобных молекул (Н) включают, но этим не ограничиваются, жирные кислоты, холестерин и его производные, длинноцепочечные алифатические углеводороды, липиды и различные полимеры, такие как, полистирол,

поли(молочную-со-гликолевую кислоту) (PLGA), а также поли(аминокислоты), состоящие преимущественно из гидрофобных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой гидрофильный полимер с несколькими присоединенными гидрофобными лигандами. В настоящем документе раскрыты разнообразные гидрофобные молекулы, применяемые для практического осуществления настоящего изобретения.

[00108] **Иммунный ответ:** Изменение активности клетки иммунной системы, такой как, В-клетка, Т-клетка или моноцит, в результате стимула, либо непосредственно, либо опосредованно, например, посредством клеточного или цитокинового посредника. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, ответ является специфическим для конкретного антигена («**антиген-специфический ответ**»). В одном варианте осуществления настоящего изобретения, иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ, такой как, CD4 Т-клеточный ответ или CD8 Т-клеточный ответ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, иммунный ответ приводит к продуцированию дополнительного Т-клеточного потомства. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, иммунный ответ приводит к движению Т-клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, ответ представляет собой В-клеточный ответ и приводит к продуцированию специфических антител или к продуцированию дополнительного В-клеточного потомства. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, ответ представляет собой антигенпрезентирующий клеточный ответ. «**Усиление иммунного ответа**» относится к совместному введению адьюванта и иммуногенного агента, такого как, пептидный антиген, в качестве части пептидного антигенного конъюгата, при этом, адьювант увеличивает желаемый иммунный ответ на иммуногенный агент, по сравнению с введением субъекту иммуногенного агента в отсутствие адьюванта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген применяется для стимуляции иммунного ответа, приводящего к активации цитотоксических Т-клеток, которые убивают инфицированные вирусом клетки или раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген применяется для индукции толерантности или иммунной супрессии. Толерогенный ответ может возникнуть в результате невосприимчивости Т-клетки или В-клетки к антигену. Супрессия иммунного ответа может возникнуть в результате активации регуляторных клеток, таких как, регуляторные Т-клетки, которые подавляют иммунный ответ, то есть, ослабляют иммунный ответ. Антигены, вводимые пациенту в отсутствие адьюванта, обычно

являются толерогенными или супрессивными, а антигены, вводимые с адьювантом, обычно стимулируют и приводят к рекрутингу, экспансии и активации иммунных клеток.

[00109] **Иммуногенная композиция:** Состав материалов, содержащих антиген и, при необходимости, адьювант, который индуцирует поддающийся измерению иммунный ответ на антиген.

[00110] **Лиганд:** Является общим термином для описания любой молекулы, которая связывается с биологическим рецептором. Агонист паттерн-распознающего рецептора представляет собой специфический тип Лиганда, который связывается с паттерн-распознающим рецептором и также может именоваться адьювантом или Лигандом с адьювантными свойствами. Например, агонист PRR представляет собой Лиганд, который связывается с PRR, таким как, TLR. Лиганд, который связывается с PRR (или PRRa), также может именоваться адьювантом, молекулярным адьювантом, адьювантной молекулой или Лигандом с адьювантными свойствами. Лиганд, который имеет ограниченную растворимость в воде, может именоваться гидрофобным Лигандом, в то время как растворимый в воде лиганд может именоваться гидрофильным Лигандом. Гидрофобный лиганд или гидрофильный лиганд, который обладает адьювантными свойствами, может именоваться гидрофобным адьювантом или гидрофильным адьювантом, соответственно.

[00111] **Сцепленный или связанный:** Термин «сцепленный» или «связанный» означает соединенные вместе, непосредственно или опосредованно. Первый фрагмент может быть ковалентно или нековалентно сцеплен со вторым фрагментом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, первая молекула сцеплена ковалентной связью с другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, первая молекула сцеплена электростатическим притяжением с другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, первая молекула сцеплена посредством диполь-дипольных сил (например, водородной связью) с другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, первая молекула сцеплена посредством Ван-дер-Ваальсовых сил (также известные, как силы Лондона) с другой молекулой. Первая молекула может быть сцеплена посредством любой и всех комбинаций таких связей с другой молекулой.

[00112] Молекулы могут быть сцеплены опосредованно, например, посредством линкера. Молекулы могут быть сцеплены опосредованно путем интерпозиции компонента, который нековалентно связывается с обеими молекулами независимо.

[00113] Применяемый в настоящем документе термин «**сцепленный**» и его варианты относятся к поддержанию молекул в химической или физической ассоциации, в

том числе после иммунизации, по меньшей мере, до тех пор, пока они не вступят в контакт с клеткой, в частности, с иммунной клеткой.

[00114] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сцепленные компоненты ассоциированы таким образом, что компоненты не могут свободно диспергироваться друг от друга, по меньшей мере, до тех пор, пока они не вступят в контакт с клеткой, такой как, иммунная клетка. Например, два компонента могут быть ковалентно сцеплены друг с другом таким образом, что эти два компонента не способны к раздельному диспергированию или диффузии. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигенные конъюгаты состоят из пептидных антигенов (А), которые ковалентно сцеплены с гидрофобной молекулой (Н) или Частицей (Р), непосредственно или опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2). Пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобную молекулу (Н), скапливаются в частицы в водных условиях, при этом, по меньшей мере, два конъюгата пептидных антигенов ассоциируются с образованием стабильного соединения, при этом, отдельные пептидные антигенные конъюгаты и компоненты, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, не способны диспергироваться или диффузировать до столкновения с клеткой, такой как, иммунная клетка.

[00115] Сцепление отличается специфическим образом от простой смеси антигена и адъюванта, такой, которая может наблюдаться, например, в обычной вакцине, например, в вакцине, содержащей растворимый в воде пептидный антиген, смешанный с адъювантом. В простой смеси, компоненты могут самостоятельно диспергироваться внутри вакцинируемой ткани и за ее пределами.

[00116] **Линкеры, предшественники линкеров и Линкер (L):** Линкер представляет собой молекулу или группу атомов, которая сцепляет или связывает, или соединяет вместе, по меньшей мере, два фрагмента. Пептидные антигенные конъюгаты, раскрытые в настоящем документе, представляют собой сложные молекулы, содержащие несколько различных функциональных компонентов (пептидный антиген (А), гидрофобную молекулу (Н) или Частицу (Р), необязательные удлинения (В1 и/или В2), необязательную заряженную молекулу (С), необязательный Линкер (L) или необязательный адъювант(ы) и так далее), которые могут быть сцеплены или соединены вместе посредством любых подходящих механизмов. Например, пептидный антиген (А), сцепленный с гидрофобной молекулой (Н), может применять линкер между пептидным антигеном (А) и гидрофобной молекулой (Н). Пептидный антиген (А) может быть сцеплен с гидрофобной молекулой (Н) или Частицей (Р), либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L), удлинений (В1 или В2) или заряженной

молекулы (С), посредством любых подходящих механизмов, включая любой подходящий линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер ковалентно присоединен к обоим связанным фрагментам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкеры являются бифункциональными, то есть, линкер включает функциональную группу на двух сайтах, при этом, функциональные группы применяются для связи линкера с двумя фрагментами. Эти две функциональные группы могут быть одинаковыми (которые рассматривались бы как гомобифункциональный линкер) или разными (которые рассматривались бы как гетеробифункциональный линкер). Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X2, содержащий гетеробифункциональный линкер, дополнительно содержащий алкин и кислоту, применяется для сцепления гидрофобной молекулы (Н), несущей амин и пептидный антиген (А), сцепленный с предшественником линкера X1, который несет азид; кислота и алкин предшественника линкера X2 вступают в реакцию с образованием амидной и триазольной связей с амином и азидом, соответственно, сцепляя, таким образом, две гетерологичные молекулы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X2, содержащий гетеробифункциональный линкер, представляет собой молекулу дибензоциклооктина (DBCO), сцепленную с кислотой. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера представляет собой кислоту, сцепленную с малеимидом, который соединяет амин и тиол, или бис(карбоновую кислоту), которая соединяет два амина. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, можно применять три- или многофункциональный линкер, при этом, сцепления являются одинаковыми или различными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепляемое удлинение (В1 или В2) N- или С-концевого пептида применяется для сцепления пептидного антигена (А) с гидрофобной молекулой (Н). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепляемое удлинение (В1 или В2) пептида является гетеробифункциональным, например, N-концевой амин удлинения В2 сцеплен с С-концом пептидного антигена (А), а С-концевая карбоксильная группа удлинения В2 сцеплена непосредственно с гидрофобной молекулой (Н). Удлинение (В1 или В2) может функционировать в качестве линкера, но не все линкеры представляют собой удлинения.

[00117] Линкеры (L) представляют собой специфические подмножества линкеров, которые являются результатом реакции между предшественником линкера X1 и предшественником линкера X2, и функционируют специфическим образом для соединения пептидного антигена (А) и гидрофобной молекулы (Н) или Частицы (Р) либо

непосредственно, либо опосредовано, посредством удлинения (B1 или B2) или заряженной молекулы (C). Линкеры выполняют специфическую функцию сайт-селективной связи, то есть, соединения вместе или сцепления пептидного антигена (A) и гидрофобной молекулы (H) или Частицы (P). Предшественник линкера X1 может быть сцеплен с пептидным антигеном, непосредственно или опосредованно, посредством удлинения (B1 или B2), как правило, во время твердофазного синтеза пептидов. Следует отметить, что предшественник линкера X1, сцепленный непосредственно с N- или C-концом пептидного антигена (A), не рассматривается в качестве удлинения, поскольку он не функционирует специфическим образом для модуляции скорости деградации пептидного антигена. Хотя предшественник линкера X1 может оказывать некоторое влияние на скорость деградации пептидного антигена (A), предшественника линкера X1 не выбирают для модуляции скорости деградации пептидного антигена (A) или его высвобождения из других молекул, но, вместо этого, он функционирует специфическим образом для соединения пептидного антигена (A) и гидрофобной молекулы (H) или Частицы (P).

[00118] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 может быть сцеплен с пептидным антигеном (A) во время твердофазного пептидного синтеза; сцепление может быть непосредственным или опосредованным, посредством удлинения (B1 или B2), включая разлагаемый пептидный линкер. Как правило, предшественник линкера X1, сцепленный непосредственно или опосредованно с пептидным антигеном (A), выбирают для стимулирования биоортогональной реакции с предшественником линкера X2, предложенным на гидрофобной молекуле (H) или Частице (P). Биоортогональные реакции позволяют осуществлять сайт-селективное сцепление пептидного антигена (A) с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P), не приводя к модификации каких-либо аминокислот, содержащих пептидный антиген (A). Предпочтительные предшественники линкеров X1, которые стимулируют биоортогональные реакции, включают предшественников линкеров, несущих азиды и алкины. Дополнительные предшественники линкеров X1, которые обеспечивают сайт-селективную реактивность, в зависимости от композиции антигена, включают тиолы, гидразины, кетоны и альдегиды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера имеет азидную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественником линкера X1 является неприродная аминокислота, несущая азид, например, азидо-лизин Lys(N₃). В таких вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A), сцепленный с предшественником линкера X1,

несущим азидную функциональность, может вступать в реакцию с предшественником линкера X2, несущим алкин, предложенным на гидрофобной молекуле (H), что приводит к образованию триазольного Линкера, который соединяет пептидный антиген (A) и гидрофобную молекулу (H). Различные предшественники линкеров (X1 и X2) и Линкеры описаны повсеместно.

[00119] В настоящем документе, и Линкер, и предшественник линкера X1 могут именоваться Меткой (T), хотя контекст Метки (T) применяется для определения того факта, является ли Метка (T) Линкером или предшественником линкера (X1). Метка (T), сцепленная с пептидным антигеном (A) либо непосредственно, либо опосредованно, посредством необязательного удлинения (B1 или B2) или необязательной заряженной молекулы (C), но не сцепленная с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P), также может именоваться предшественником линкера X1. Метка (T), которая сцепляет пептидный антиген (A) с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P), также может именоваться Линкером (L). Предшественник линкера X2 вступает в реакцию с предшественником линкера X1 с образованием Линкера. Предшественник линкера X1 иногда может именоваться Меткой, а предшественник линкера X2 может именоваться реакционноспособным фрагментом метки или реакционноспособной молекулой метки, содержащей функциональную группу, которая является специфической или реакционноспособной по отношению к Метке.

[00120] **Суммарный заряд:** Сумма электростатических зарядов, переносимых молекулой или, если это указано, участком молекулы.

[00121] **Частица:** Нано- или микроразмерная надмолекулярная структура, состоящая из скопления молекул. Пептидные антигенные конъюгаты по настоящему изобретению содержат либо пептидные антигены (A), сцепленные с предварительно образованными Частицами (P), либо гидрофобные молекулы (H), которые скапливаются в мицеллы или другие надмолекулярные структуры. Частицы, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, могут быть привнесены в клетки (например, иммунные клетки, такие как, антигенпрезентирующие клетки). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат образует частицу в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, образование частиц пептидным антигенным конъюгатом зависит от рН или температуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, наночастицы, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов, имеют средний диаметр от 5 нанометров (нм) до 500 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, наночастицы, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов, могут быть больше 100 нм. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, наночастицы, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов, включены в более крупные структуры частиц, которые слишком велики для поглощения иммунными клетками (например, частицы размером более 5000 нм), и они медленно высвобождают более мелкие наночастицы, содержащие пептидный антигенный конъюгат.

[00122] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобную молекулу (Н), образуют наночастицы. Наночастицы образуются путем ассоциации пептидных антигенных конъюгатов посредством гидрофобных взаимодействий и поэтому могут рассматриваться как надмолекулярное скопление. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, наночастица представляет собой мицеллу. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, мицеллы наночастиц имеют диаметр от 5 до 50 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат образует мицеллы, и образование мицелл зависит от температуры, рН или как от температуры, так и от рН. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, раскрытые наночастицы содержат пептидные антигенные конъюгаты, которые состоят из пептидных антигенов (А), сцепленных с гидрофобной молекулой (Н), состоящей из полимеров, сцепленных с Лигандом с адъювантными свойствами, например, с агонистом PRR; сцепление пептидного антигена с агонистом PRR в наночастицах предотвращает свободное диспергирование агониста PRR после введения субъекту, что тем самым предотвращает системную токсичность.

[00123] Частица может быть образована скоплением отдельных молекул, содержащих пептидные антигенные конъюгаты, или, в случае пептидного антигенного конъюгата, состоящего из пептидного антигена (А), сцепленного с предварительно образованной Частицей (Р), частица может быть поперечно сцепленной посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий.

[00124] **Предварительно образованная Частица (Р) / Частица (Р) формулы:** Предварительно образованная Частица (Р) или просто «Частица» (Р) описывает Частицу, которая уже образована до сцепления с пептидным антигеном (А). Таким образом, Частица (Р) применяется для описания Частицы формулы и отличается от частиц, образованных скоплением, по меньшей мере, двух пептидных антигенных конъюгатов, содержащих гидрофобную молекулу (Н). Для ясности, частицы, образованные скоплением пептидных антигенных конъюгатов, отличаются от предварительно образованных Частиц (Р) или Частиц (Р) формулы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) может быть сцеплен непосредственно

или опосредованно с Частицей (P) с образованием пептидного антигенного конъюгата, и пептидный антигенный конъюгат может представлять собой частицу в водных условиях.

[00125] Для разграничения частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, и предварительно образованных Частиц (P), буква p всегда пишется с заглавной буквы в слове «Particle» - «Частица», за которой следует вводное слово, состоящее из заглавной буквы «P», то есть, «Частица (P)», когда речь идет о предварительно образованной Частице или Частице (P) формулы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Частица (P) может представлять собой Частицу (P) PLGA, которая образуется в водных условиях и затем сцепляется с пептидным антигеном (A) с образованием пептидного антигенного конъюгата, который остается в виде частиц в водных условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Частица (P) может состоять из липидов, таких как, липосомальная Частица (P), которая образуется в водных условиях и затем сцепляется с пептидными антигенами (A) с образованием пептидного антигенного конъюгата, который остается в виде частиц в водных условиях.

[00126] **Паттерн-распознающие рецепторы (PRR):** Рецепторы, экспрессируемые различными клеточными популяциями, в частности, природными иммунными клетками, которые связываются с разнородной группой из синтетических молекул и молекул природного происхождения, именуемых патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), а также молекулярными паттернами, ассоциированными с повреждениями (DAMP). PAMP представляют собой консервативные молекулярные мотивы, присутствующие на определенных микроорганизмах и вирусах. DAMP представляют собой клеточные компоненты, которые высвобождаются или экспрессируются во время гибели или повреждения клеток.

[00127] PAMP-активация или DAMP-активация паттерн-распознающих рецепторов индуцирует внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий к изменению физиологии клетки-хозяина. Такие физиологические изменения могут включать изменения в транскрипционном профиле клетки для индукции экспрессии целого ряда провоспалительных и способствующих выживанию генов. Скоординированная экспрессия этих генов может усиливать адаптивный иммунитет.

[00128] Существует несколько классов PRR. Неограничивающие примеры PRR включают Толл-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR), NOD-подобные рецепторы (NLR), рецептор Стимулятора Генов Интерферона (STING) и рецепторы лектина С-типа (CLR). Агонисты таких PRR могут быть применены для усиления иммунного ответа на антиген-мишень.

[00129] Агонисты PRR представляют собой адъюванты и могут именоваться Лигандами или Лигандами с адъювантными свойствами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, агонисты PRR применяются в качестве адъювантов для усиления иммунного ответа на пептидный антиген.

[00130] Толл-подобные рецепторы (TLR) 1-13 представляют собой трансмембранные PRR, которые распознают разнообразный диапазон PAMP. Существует две широкие категории TLR: одни локализованы на поверхности клетки, и другие локализованы в эндосомальном люмене. TLR, которые присутствуют на клеточной поверхности, обычно важны для распознавания бактерий. TLR, которые локализованы в эндосомальном люмене, такие как, TLR 3, 7, 8 и 9, служат для распознавания нуклеиновых кислот и, таким образом, обычно важны для распознавания вирусов и, следовательно, для стимулирования противовирусных иммунных ответов. Полиинозин-полицитидиловая кислота представляет собой лиганд для TLR-3. TLR-7 и TLR-8 распознают одноцепочечную РНК, а также аналоги нуклеотидных оснований и имидазохинолины. TLR-9 распознает неметилованную дезоксицитидилат-фосфат-дезоксигуанилатную (CpG) ДНК, обнаруживаемую, главным образом, в бактериях.

[00131] NOD-подобные рецепторы (NLR) и RIG-I-подобные рецепторы (RLR) локализуются в цитоплазме. Неограничивающие примеры RLR включают RIG-I, MDA5 и LGP2. Существует 22 человеческих NLR, которые можно подразделить на пять структурно родственных семейств NLR A, B, C, P и X. Все NLR имеют три домена: N-концевой домен, участвующий в передаче сигналов, нуклеотид-связывающий NOD-домен и C-концевая богатая лейцином область (LRR), важная для распознавания лигандов. Неограничивающие примеры NLR включают NALP3 и NOD2.

[00132] Для получения дополнительной информации о паттерн-распознающих рецепторах см. Уэльс и др., *Biochem Soc Trans.*, 35:1501-1503, 2007.

[00133] **Пептид или полипептид:** По меньшей мере, два природных или неприродных аминокислотных остатка, которые соединены вместе посредством амидной связи. Аминокислотные остатки могут содержать посттрансляционную модификацию(и) (например, гликозилирование и/или фосфорилирование). Такие модификации могут имитировать посттрансляционные модификации природного происхождения *in vivo*, или неприродного происхождения. Любой, по меньшей мере, один компонент пептидного антигенного конъюгата может состоять из пептидов.

[00134] Не существует концептуального верхнего предела длины пептида. Длину пептида обычно выбирают в зависимости от применения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) состоит из пептида,

длина которого может составлять от 3 до 1000 аминокислот, но обычно не более 300 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N- и/или C-концевое удлинение (B1 и/или B2) представляет собой пептид длиной, примерно, от 1 до 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) представляет собой пептид, состоящий из положительно, отрицательно или как положительно, так и отрицательно заряженных аминокислот, и обычно имеет длину не более 16 аминокислот.

[00135] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) представляет собой пептид, содержащий от 5 до, примерно, 50 аминокислот, обычно от, примерно, 7 до 35 аминокислот, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 аминокислот. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) имеет длину, примерно, по меньшей мере, 50 аминокислот. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) может быть рассмотрен как белок.

[00136] Следует отметить, что пептидный антиген (A) может представлять собой минимальный эпитоп (иногда именуемый как min или ME) или длинный пептид (иногда именуемый как LP или SLP), который содержит минимальный эпитоп. Следовательно, когда говорят, что минимальный эпитоп или длинный пептид доставляется в виде пептидного антигенного конъюгата, подразумевают, что минимальный эпитоп или длинный пептид представляет собой пептидный антиген (A), если не указано иное.

[00137] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, необязательная заряженная молекула (C), антиген (A), необязательные удлинения (B1 и B2) и предшественник линкера X1 представляют собой аминокислоты и могут быть получены твердофазным пептидным синтезом в виде непрерывной пептидной последовательности, иногда именуемой **«фрагментом пептидного антигена»**. Следует отметить, что расчет суммарного заряда или GRAVY фрагмента пептидного антигена не включает предшественник линкера X1.

[00138] Пептидные последовательности, относящиеся к пептидному антигену, обозначены как «PA», пептидные последовательности, относящиеся к N-концевому удлинению (B1), обозначены как «PN», а пептидные последовательности, относящиеся к C-концевому удлинению (B2), обозначены как «PC». Последовательности аминокислот, содержащих пептидные антигены (A), представлены формулой PA1...PAn, при этом, PA представляет собой любой аминокислотный остаток, содержащий пептидный антиген (A), а n представляет собой целочисленное значение. Например, пептидный антиген из 8

аминокислот (A) может быть представлен как PA1-PA2-PA3-PA4-PA5-PA6-PA7-PA8. Последовательности аминокислот, содержащих N-концевые удлинения (B1), представлены формулой, PN...PNn, при этом, PN представляет собой любой аминокислотный остаток, содержащий N-концевое удлинение, а n представляет собой целочисленное значение. Последовательности аминокислот, содержащих C-концевые удлинения (B2), представлены формулой, PC1...PCn, при этом, PC представляет собой любой аминокислотный остаток, содержащий C-концевое удлинение, а n представляет собой целочисленное значение.

[00139] **Пептидные модификации:** Пептиды могут быть изменены или иным образом синтезированы с, по меньшей мере, одной модификацией, как указано ниже. Кроме того, аналоги (непептидные органические молекулы), производные (химически функционализированные пептидные молекулы, полученные изначально из пептида), и варианты (гомологи) этих пептидов могут быть применены в способах, описанных в настоящем документе. Описанные в настоящем документе пептиды состоят из последовательности аминокислот, аналогов, производных и вариантов, которые могут представлять собой L- и/или D-версии. Такие пептиды могут содержать пептиды, аналоги, производные и варианты природного происхождения и другие.

[00140] Пептиды могут быть модифицированы посредством различных химических способов для продуцирования производных, обладающих по существу той же активностью, что и немодифицированные пептиды, и, необязательно, имеющих другие желаемые свойства. Например, группы карбоновых кислот пептида, либо на карбоксильном конце, либо на боковой цепи, могут быть предложены в форме соли фармацевтически приемлемого катиона или этерифицированы с образованием эфира C₁-C₁₆, при этом, C₁ относится к углеродной цепи (и, таким образом, C₁ относится к одиночному углероду, а C₁₆ относится к 16 углеродам) или преобразованы в амид. Аминогруппы пептида, либо на амино-конце, либо на боковой цепи, могут быть в форме фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты, такой как, HCl, HBr, уксусная, трифторуксусная, муравьиная, бензойная, толуолсульфоновая, малеиновая, винная и другие органические соли, или они могут быть модифицированы или преобразованы в амид.

[00141] Аминокислота может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала, посредством ковалентного сцепления, агонист PRR, такой как, агонист TLR, например, агонист TLR-7 на основе имидазохинолина или TLR-7/8.

[00142] Пептиды могут быть модифицированы таким образом, чтобы они содержали группы заместителей, которые содержат положительный или отрицательный

заряд, или оба заряда. На положительный и/или отрицательный заряд может влиять рН, при котором присутствует пептид.

[00143] Гидроксильные группы пептидных боковых цепей могут быть преобразованы в CC_1 - CC_{16} алкокси или в эфир CC_1 - CC_{16} с применением широко известных методов, или гидроксильные группы могут быть преобразованы (например, сульфатированы или фосфорилированы) для введения отрицательного заряда. Фенильные и фенольные кольца пептидных боковых цепей могут быть замещены, по меньшей мере, одним атомом галогена, таким как, фтор, хлор, бром или йод, или CC_1 - CC_{16} алкил, CC_1 - CC_{16} алкокси, карбоновые кислоты и их эфиры или амиды таких карбоновых кислот. Метиленовые группы пептидных боковых цепей могут быть удлинены до гомологичных CC_2 - CC_4 алкиленов. Тиолы могут применяться для образования дисульфидных связей или тиоэфиров, например, посредством реакции с малеимидом. Тиолы могут быть защищены любой из целого ряда широко известных защитных групп, таких как, ацетамидные группы. Специалисты в данной области техники также смогут определить способы введения циклических структур в пептиды по настоящему изобретению, посредством которых можно выбрать и предложить конформационные ограничения для структуры, приводящие к усиленной стабильности. В качестве ссылки, можно привести работу Грина и др., «*Защитные группы Грина в органическом синтезе*», Четвертое издание, John Wiley & Sons, Inc. 2006, для получения более подробной информации о дополнительных модификациях, которые могут быть осуществлены в отношении функциональных групп.

[00144] Предусмотрены пептидомиметические и органомиметические варианты осуществления пептидного антигена (А), посредством которых трехмерное расположение химических компонентов таких пептидо- и органомиметиков имитирует трехмерное расположение пептидного остова и боковых цепей входящей в состав аминокислоты, в результате чего создаются такие пептидо- и органомиметики иммуногенного пептида, обладающего способностью к измерению для индукции толерантности или иммунной супрессии, или усиленной способностью генерировать стимулирующий иммунный ответ, такой как, цитотоксический Т-клеточный ответ или ответ антитела.

[00145] **Фармацевтически приемлемые транспортеры:** Фармацевтически приемлемые носители (транспортеры), подходящие для настоящего изобретения, являются стандартными. В работе «*Фармацевтические науки Ремингтона*», Э.У. Мартина, Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, 15е издание (1975), описаны композиции и составы, пригодные для фармацевтической доставки, по меньшей мере, одной терапевтической композиции, такой как, по меньшей мере, одна терапевтическая противораковая вакцина и дополнительный фармацевтический агент.

[00146] В целом, характер носителя будет зависеть от конкретного применяемого режима введения. Например, парентеральные составы обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как, вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или тому подобное в качестве транспортера. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюли, таблетки или капсулы), стандартные нетоксичные твердые носители могут включать, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции для введения могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как, увлажняющие или эмульгирующие агенты, консерванты и буферизирующие агенты для поддержания pH и тому подобное, например, ацетат натрия или сорбитанмонолаурат.

[00147] **Полярный:** Описание свойств вещества. Термин «полярный» означает относительное понятие и может описывать молекулу или часть молекулы, которая имеет частичный заряд, возникающий из-за различий в электроотрицательности между атомами, связанными вместе в молекуле, например, связь между азотом и водородом. Полярные молекулы предпочитают взаимодействовать с другими полярными молекулами и обычно не ассоциируются с неполярными молекулами. В конкретных, неограничивающих случаях, полярная группа может содержать гидроксильную группу или аминогруппу, или карбоксильную группу, или заряженную группу. В конкретных, неограничивающих случаях, полярная группа может предпочитать взаимодействовать с полярным растворителем, таким как, вода. В конкретных, неограничивающих случаях, введение дополнительных полярных групп может повысить растворимость части молекулы.

[00148] **Полимер:** Молекула, содержащая повторяющиеся структурные звенья (мономеры). Как более подробно описано в настоящем изобретении, полимеры могут применяться для любого количества компонентов пептидного антигенного конъюгата и могут быть природными или синтетическими. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобный или амфифильный полимер применяется в качестве гидрофобной молекулы (Н) и управляет скоплением частиц пептидных антигенных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой полимер, содержащий аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (В1 и В2) содержат полимеры, такие как, например, PEG, поли(аминокислоты) или их комбинации. Полимеры, включенные в раскрытые варианты осуществления настоящего изобретения, могут образовывать полимерные наночастицы, которые можно

вводить субъекту, не вызывая неблагоприятных побочных эффектов. Полимеры, включенные в раскрытые варианты осуществления настоящего изобретения, могут образовывать полимерные наночастицы, которые можно вводить субъекту, чтобы вызывать иммунный ответ или для лечения, и/или уменьшения интенсивности заболевания. Полимеры, включенные в раскрытые варианты осуществления настоящего изобретения, могут включать боковую цепь с функциональной группой, которую можно использовать, например, для облегчения сцепления с адьювантом или молекулой, применяемой для индукции иммунной супрессии или толерантности, такой как, макролиды, например рапамицин. В нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер может содержать, по меньшей мере, два полимерных блока, сцепленных посредством линкера, для создания блок-сополимера, такого как, амфифильный диблок-сополимер. В нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, полимерный блок может быть преимущественно гидрофобным по своему характеру. В нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер состоит из пептидов, их аналогов, производных и вариантов. Различные композиции полимеров, подходящие для практического применения настоящего изобретения, обсуждаются более подробно в других источниках.

[00149] **Полимеризация:** Химическая реакция, обычно проводимая с катализатором, нагреванием или светом, в которой мономеры объединяются, образуя цепочечную или поперечно сцепленную макромолекулу (полимер). Кроме того, цепи могут быть объединены путем дополнительного химического синтеза с применением соответствующих групп заместителей и химических реакций. Мономеры могут содержать химически активные вещества. Полимеризация обычно происходит путем добавления или конденсации. Аддитивная полимеризация происходит, когда инициатор, обычно свободный радикал, вступает в реакцию с двойной связью в мономере. Свободный радикал добавляется к одному боку двойной связи, продуцируя свободный электрон на другой стороне. Этот свободный электрон затем вступает в реакцию с другим мономером, и цепь становится самораспространяющейся, добавляя, таким образом, за один раз одно звено мономера к концу растущей цепи. Конденсационная полимеризация включает реакцию двух мономеров, приводящую к отщеплению молекулы воды. В других формах полимеризации, мономер добавляют по одному за раз в растущую цепь посредством поэтапного введения активированных мономеров, например, во время твердофазного пептидного синтеза.

[00150] **Очищенный:** Композиция, которая, в целом, не содержит примесей или веществ, которые ухудшают качество или загрязняют вещество. Термин «очищенный»

означает относительное понятие и не предполагает абсолютной чистоты. Таким образом, например, препарат из очищенного пептида представляет собой препарат, в котором пептид или белок является более обогащенным, чем пептид или белок, находящийся в своей естественной среде, например, в клетке. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, препарат очищают таким образом, что пептидный антигенный конъюгат составляет, по меньшей мере, 50% от общего содержания препарата. Существенная очистка означает очистку от других белков или клеточных компонентов. Существенно очищенный белок имеет чистоту, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99%. Таким образом, в одном конкретном неограничивающем примере существенно очищенный белок на 90% не содержит других белков или клеточных компонентов, или загрязняющих пептидов.

[00151] **Растворимый:** Способный стать молекулярно или ионно диспергированным в растворителе с образованием гомогенного раствора. Когда речь идет о пептиде, под растворимым пептидом понимают одиночную молекулу в растворе, которая не собирается в мультимеры или другие надмолекулярные структуры в результате гидрофобных или других нековалентных взаимодействий. Под растворимой молекулой понимают, что она свободно диспергируется в растворе в виде одиночных молекул. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген может представлять собой растворимый пептидный антиген, который растворяется, до концентрации, по меньшей мере, 0,1 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 при комнатной температуре. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат может быть растворим в диметилсульфоксиде и/или в другом органическом растворителе(ях) при комнатной температуре, но он может быть и не растворим в водном растворителе(ях), таком как, фосфатно-солевой буферный раствор, с рН 7,4 при комнатной температуре. Гидрофобные молекулы, описанные в настоящем документе, являются нерастворимыми вплоть до концентрации, примерно, 0,1 мг/мл. Растворимость может быть определена путем визуального осмотра, измерений мутности или методом динамического рассеяния света.

[00152] **Субъект:** Относится как к человеку, так и к нечеловекообразным животным, в том числе, к птицам и к нечеловекообразным млекопитающим, таким как, грызуны (например, мыши и крысы), нечеловекообразным приматам (например, макаки-резус), домашним животным (например, домашние собаки и кошки), домашнему скоту (например, свиньи, овцы, коровы, ламы и верблюды), а также к не домашним животным (например, большие кошки).

[00153] **Надмолекулярный:** Относится к, по меньшей мере, двум молекулам, ассоциированным посредством нековалентных взаимодействий. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, молекулы ассоциируются благодаря гидрофобным взаимодействиям. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, молекулы ассоциируются благодаря электростатическим взаимодействиям. Ассоциация наделяет надмолекулярный комплекс новым свойством, которое не имеет ни одна из составляющих молекул, таким как, увеличенный размер, который влияет на взаимодействие материалов с иммунной системой и на различные иммунные ответы. Например, пептидные антигенные конъюгаты могут агрегировать с образованием надмолекулярных комплексов.

[00154] **Т-Клетка:** Тип белой кровяной клетки, которая представляет собой часть иммунной системы и может участвовать в иммунном ответе. Т-клетки включают, но этим не ограничиваются, CD4 Т-клетки и CD8 Т-клетки. CD4 Т-клетка отображает CD4 гликопротеин на своей поверхности, и эти клетки часто именуют Т-хелперами. Эти клетки зачастую координируют иммунные ответы, включая ответы антител и цитотоксические Т-клеточные ответы, однако CD4 Т-клетки также могут супрессировать иммунные ответы, или CD4 Т-клетки могут действовать как цитотоксические Т-клетки. CD8 Т-клетка отображает CD8 гликопротеин на своей поверхности, и эти клетки зачастую именуют цитотоксическими или киллерными Т-клетками, однако CD8 Т-клетки также могут супрессировать иммунные ответы.

[00155] **Телехелатный:** Применяется для описания полимера, который имеет один или два химически активных конца, которые могут быть одинаковыми или разными. Это слово происходит от слов *telos* и *chele*, греческих слов, обозначающих конец и коготь, соответственно. Полутелехелатный полимер описывает полимер толь с одной концевой группой, такой как, химически активная функциональная группа, которая может подвергаться дополнительным реакциям, таким как, полимеризация. Гетеротелехелатный полимер описывает полимер с двумя концевыми группами, такими как, химически активные функциональные группы, которые имеют разные химически активные свойства.

[00156] В настоящем документе, гидрофобные молекулы (Н) могут состоять из полимеров с химически активными группами на одном или обоих концах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, адъювант размещается на одном конце полимера, а с другим концом полимера может вступать в реакцию линкер, который сцеплен с пептидным антигеном непосредственно или опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2) или Линкера (L). В этом примере, полимер является

полутелехелатным по отношению к адьюванту, а это означает, что адьювант прикреплен только к одному концу полимерной цепи, содержащей гидрофобную молекулу (Н).

[00157] **Лечение, профилактика или уменьшение интенсивности заболевания:** «**Лечение**» относится к вмешательству, которое уменьшает признак или симптом, или маркер заболевания, или патологическое состояние после того, как оно начало развиваться. Например, лечение заболевания может привести к уменьшению опухолевой нагрузки, что означает уменьшение количества или размера опухолей и/или метастазов, или лечение заболевания может привести к иммунной толерантности, которая уменьшает системы, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. «**Профилактика**» заболевания относится к ингибированию полномасштабного развития заболевания. Можно предотвратить развитие заболевания в полном масштабе. Можно предотвратить развитие тяжести, степени или вида заболевания. «**Уменьшение интенсивности**» относится к уменьшению количества или тяжести признаков или симптомов, или маркера заболевания, например, такого как рак.

[00158] Уменьшение признака или симптома, или маркера заболевания, или патологического состояния, связанного с заболеванием, относится к любому наблюдаемому полезному эффекту лечения и/или к любому наблюдаемому эффекту на проксимальной, суррогатной конечной точке, например, относится к объему опухоли, независимо от того, является ли этот эффект симптоматическим или не является. Об уменьшении признака или симптома, ассоциированного с опухолью или вирусной инфекцией, может судить, например, по отсроченному началу клинических симптомов заболевания у восприимчивого субъекта (такого как, субъект, имеющий опухоль, которая еще не метастазировала, или субъект, который может быть подвержен вирусной инфекции), по уменьшению тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, по более медленному прогрессированию заболевания (например, путем продления жизни субъекта, имеющего опухоль или вирусную инфекцию), по уменьшению количества рецидивов заболевания, по улучшению общего состояния здоровья или самочувствия субъекта, или по другим параметрам, являющимся общеизвестными в данной области техники (например, являющимся специфическими для конкретной опухоли или вирусной инфекции). «**Профилактическое**» лечение представляет собой лечение, назначаемое субъекту, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, с целью уменьшения риска или тяжести развития патологии.

[00159] В одном примере, желаемым ответом является индукция иммунного ответа, который приводит к уменьшению размера, объема, скорости роста или количества

(например, метастазы) опухолей у субъекта. Например, агент или агенты могут индуцировать иммунный ответ, который уменьшает размер, объем или количество опухолей на желаемое количество, например, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95%, по сравнению с ответом в отсутствие агента.

[00160] **Опухолевый или раковый, или неопластический:** Аномальный рост клеток, который может быть доброкачественным или злокачественным, зачастую, но не всегда, вызывающий клинические симптомы. Рост «**неопластических**» клеток относится к росту клеток, которые не отвечают на физиологические стимулы, такие как, факторы роста и ингибирующие факторы.

[00161] «**Опухоль**» представляет собой совокупность неопластических клеток. В большинстве случаев, опухоль относится к совокупности неопластических клеток, которые образуют солидное образование. Такие опухоли могут именоваться солидными образованиями. В некоторых случаях, неопластические клетки могут не образовывать солидное образование, такое как в случае с некоторыми лейкозами. В таких случаях, совокупность неопластических клеток может именоваться гемобластомами.

[00162] Рак относится к злокачественному росту неопластических клеток, которые являются солидными образованиями или гемобластомами. Признаки рака, которые определяют его как злокачественное заболевание, включают метастазы, вмешательство в нормальное функционирование соседних клеток, выброс цитокинов или других секреторных веществ на аномальных уровнях и супрессию или усугубление воспалительного или иммунологического ответа(ов), инвазию окружающих или дистантных тканей или органов, таких как лимфатические узлы и так далее.

[00163] Опухоль, которая не имеет существенных неблагоприятных клинических симптомов и/или медленно растет, именуется «**доброкачественной**».

[00164] «**Злокачественный**» означает вызывающий или, способный с большой вероятностью вызвать в будущем существенные клинические симптомы. Опухоль, которая проникает в окружающие ткани и/или метастазирует, и/или продуцирует существенные клинические симптомы посредством продукции и секреции химических медиаторов, воздействующих на близлежащие или дистантные системы организма, именуется «**злокачественной**».

[00165] «**Метастатический процесс**» относится к раковым клеткам, которые покинули исходный сайт опухоли и мигрировали в другие части тела, например через

кровоток, через лимфатическую систему или через полости тела, такие как, перитонеальная полость или полость грудной клетки.

[00166] Количество опухоли у индивидуума является **«опухолевым нагружкой»**. Опухолевая нагрузка может быть измерена как количество, объем или масса опухоли и зачастую оценивается с помощью физического обследования, рентгеновской визуализации или патологического исследования.

[00167] **«Развившаяся»** или **«существующая»** опухоль представляет собой опухоль, которая существует на момент начала терапии. Развившаяся опухоль зачастую может быть обнаружена посредством диагностических тестов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, развившаяся опухоль может пальпироваться. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, развившаяся опухоль имеет размер, по меньшей мере, 500 мм^3 , например, по меньшей мере, 600 мм^3 , по меньшей мере, 700 мм^3 или, по меньшей мере, 800 мм^3 . В других вариантах осуществления настоящего изобретения, опухоль имеет длину, по меньшей мере, 1 см. Что касается солидной опухоли, то развившаяся опухоль, как правило, обладает вновь развившимся и устойчивым кровоснабжением и, возможно, индуцировала регуляторные Т-клетки (Tregs) и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC).

[00168] Человеку обычной квалификации в данной области техники будет понятно, что предложенные выше определения не предназначены для включения недопустимых схем замещения (например, замещение метила 5 различными группами, и тому подобное). Человек обычной квалификации в данной области техники сможет легко распознать такие недопустимые схемы замещения. Любая функциональная группа, раскрытая в настоящем документе и/или определенная выше, может быть замещенной или незамещенной, если в настоящем документе не указано иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые, как правило, понятны человеку обычной квалификации в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Термины «a», «an» и «the», употребляемые в единственном числе, включают множественное число, если в контексте явно не указано иное. Термин «содержит» означает «включает». Следовательно, содержащий «А» или «В» включает А, включает В или включает как А, так и В. Кроме того, следует понимать, что все размеры оснований или размеры аминокислот, и все значения молекулярной массы или молекулярного веса, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и представлены в целях описания. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем документе, можно применять на практике или при проведении испытаний в

связи с настоящим изобретением, в настоящем документе описаны подходящие способы и материалы. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая пояснения терминов, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не ограничивают настоящее изобретение.

Иммуногенные композиции

[00169] В настоящем документе описаны новые иммуногенные композиции, содержащие частицы, которые содержат пептидный антигенный конъюгат, который дополнительно содержит пептидный антиген (А), сцепленный с Частицей (Р) или гидрофобной молекулой (Н). Пептидный антигенный конъюгат относится к соединению, которое образуется в результате сцепления, например, посредством ковалентного или иного соединения, пептидного антигена (А) с Частицей (Р) или гидрофобной молекулой (Н). Гидрофобная молекула (Н) или Частица (Р) заставляет пептидный антигенный конъюгат скапливаться в частицы, что приводит к неожиданному улучшению иммунных ответов, направленных на пептидный антиген (А). Пептидный антигенный конъюгат может дополнительно содержать необязательное N-концевое удлинение (В1) и/или C-концевое удлинение (В2), сцепленное с N- и C-концами пептидного антигена (А), соответственно, что предлагает неожиданные улучшения изготовления и биологической активности; необязательную заряженную молекулу (С), которая предлагает неожиданные улучшения стабильности частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, что приводит к улучшению изготовления и улучшенной биологической активности; и необязательный Линкер (L), который возникает в результате вступления в реакцию предшественника линкера X1, сцепленного с пептидным антигеном (А), и предшественника линкера X2, предложенного на гидрофобной молекуле (Н) или Частице (Р), в результате чего происходит соединение пептидного антигена (А) и гидрофобной молекулы (Н), и Частицы (Р) в эффективном процессе, который приводит к неожиданным улучшениям в эффективности изготовления пептидных антигенных конъюгатов. Компоненты, содержащие пептидный антигенный конъюгат, могут быть сцеплены любым подходящим механизмом и описаны более подробно повсеместно.

[00170] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен непосредственно с гидрофобной молекулой (Н) или Частицей (Р) с образованием пептидного антигенного конъюгата формулы А-Н или А-Р. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен с гидрофобной молекулой (Н) или Частицей (Р) посредством Линкера (L) с образованием пептидного антигенного конъюгата формулы А-L-Н или А-L-Р. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен с

удлинением (B1 или B2), которое сцеплено либо непосредственно, либо посредством Линкера (L) с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P) с образованием пептидного антигенного конъюгата любой из формул, A-B2-H, A-B2-L-H, H-B1-A, H-L-B1-A, A-B2-P, A-B2-L-P, P-B1-A или P-L-B1-P. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен непосредственно или посредством удлинения (B1 и B2) с предшественником линкера X1 с образованием фрагмента пептидного антигена формулы A-X1, A-B2-X1, X1-A или X1-B1-A, который вступает в реакцию с предшественником линкера X2 на гидрофобной молекуле (H) или Частице (P), то есть, X2-H или X2-P, с образованием Линкера (L), который присоединяет пептидный антиген (A) к гидрофобной молекуле (H) или Частице (P), что приводит к пептидному антигенному конъюгату любой из формул, то есть, A-L-H, A-L-P, A-B2-L-H, A-B2-L-P, H-L-A, P-L-A, H-B1-A, или P-B1-A. В настоящем изобретении, в такие варианты осуществления показано, что частицы образуются в водных условиях, которые, как показано, подходят для индуцирования иммунного ответа у субъекта.

[00171] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен с обоими удлинениями (B1 и B2). Такие варианты осуществления настоящего изобретения, включают пептидные антигенные конъюгаты формулы B1-A-B2-H, B1-A-B2-L-H, B1-A-B2-P, B1-A-B2-L-P, H-B1-A-B2, H-L-B1-A-B2, P-B1-A-B2 или P-L-B1-A-B2. В настоящем изобретении, в такие варианты осуществления показано, что частицы образуются в водных условиях, которые, как продемонстрировано, подходят для индуцирования иммунного ответа у субъекта.

[00172] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, молекулы, содержащие функциональные группы, которые придают электростатический заряд, то есть, заряженные молекулы (C), сцеплены непосредственно или опосредованно, посредством необязательных удлинений (B1 и/или B2), необязательного Линкера (L) или гидрофобной молекулы (H), или Частицы (P), с пептидным антигеном (A). Заряд, придаваемый пептидному антигенному конъюгату заряженной молекулой, стабилизирует надмолекулярные структуры, образованные в водных условиях. Неограничивающие примеры пептидных антигенных конъюгатов, содержащих заряженные молекулы (C), включают C-A-H, C-B1-A-H, C-A-B2-H, C-B1-A-B2-H, A-H(C), A-B2-H(C), B1-A-H(C), B1-A-B2-H(C), C1-A-H(C2), C1-A-B2-H(C2), C1-B1-A-H(C2), C1-B1-A-B2-H(C2), H-A-C, H-B1-A-C, H-A-B2-C, H-B1-A-B2-C, H(C)-A, H(C)-B1-A, H(C)-A-B2, H(C)-B1-A-B2, H(C1)-A-C2, H(C1)-B1-A-C2, H(C1)-A-B2-C2, H(C1)-B1-A-B2-C2, C-A-L-H, C-B1-A-L-H, C-A-B2-L-H, C-B1-A-B2-L-H, A-L-H(C), A-B2-L-H(C), B1-A-L-H(C), B1-A-B2-L-H(C), C1-A-L-H(C2), C1-A-B2-L-H(C2), C1-B1-A-L-H(C2), C1-B1-A-B2-L-H(C2), H-L-A-C, H-L-B1-

A-C, H-L-A-B2-C, H-L-B1-A-B2-C, H(C)-L-A, H(C)-L-B1-A, H(C)-L-A-B2, H(C)-L-B1-A-B2, H(C1)-L-A-C2, H(C1)-L-B1-A-C2, H(C1)-L-A-B2-C2, H(C1)-L-B1-A-B2-C2, C-A-P, C-B1-A-P, C-A-B2-P, C-B1-A-B2-P, A-P(C), A-B2-P(C), B1-A-P(C), B1-A-B2-P(C), C1-A-P(C2), C1-A-B2-P(C2), C1-B1-A-P(C2), C1-B1-A-B2-P(C2), P-A-C, P-B1-A-C, P-A-B2-C, P-B1-A-B2-C, P(C)-A, P(C)-B1-A, P(C)-A-B2, P(C)-B1-A-B2, P(C1)-A-C2, P(C1)-B1-A-C2, P(C1)-A-B2-C2, P(C1)-B1-A-B2-C2, C-A-L-P, C-B1-A-L-P, C-A-B2-L-P, C-B1-A-B2-L-P, A-L-P(C), A-B2-L-P(C), B1-A-L-P(C), B1-A-B2-L-P(C), C1-A-L-P(C2), C1-A-B2-L-P(C2), C1-B1-A-L-P(C2), C1-B1-A-B2-L-P(C2), P-L-A-C, P-L-B1-A-C, P-L-A-B2-C, P-L-B1-A-B2-C, P(C)-L-A, P(C)-L-B1-A, P(C)-L-A-B2, P(C)-L-B1-A-B2, P(C1)-L-A-C2, P(C1)-L-B1-A-C2, P(C1)-L-A-B2-C2 или P(C1)-L-B1-A-B2-C2.

[00173] Заряженная молекула (C) стабилизирует частицы, образованные пептидными антигенными конъюгатами. Заряженная молекула (C) может быть сцеплена непосредственно с пептидным антигенным конъюгатом. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) может быть предложена на отдельной молекуле, которая ассоциируется с частицами, образованными пептидными антигенными конъюгатами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) сцеплена с гидрофобной молекулой (H) с образованием конъюгата заряженной молекулы формулы C-H или C-A'-H (при этом, A' представляет собой консервативный антиген), который смешан с пептидным антигенным конъюгатом формулы [C]-[B1]-A-[B2]-[L]-H, где [] обозначает, что группа является необязательной, в водных условиях, и полученные в результате частицы содержат C-H или C-A'-H и пептидный антигенный конъюгат.

[00174] Гидрофобная молекула (H) может содержать любую подходящую молекулу, которая индуцирует скопление в частицы пептидного антигенного конъюгата в водных условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H), содержащая пептидный антигенный конъюгат, представляет собой полимер с ограниченной растворимостью в воде. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер, чувствительный к температуре или pH, который имеет ограниченную растворимость в воде при определенных температурах или значениях pH. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой липид, жирную кислоту или холестерин. Многие гидрофобные молекулы (H) являются подходящими для настоящего изобретения и описаны более подробно повсеместно.

[00175] Частицы, образованные пептидными антигенными конъюгатами, раскрытыми в настоящем описании, являются подходящими для индуцирования иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, субъекту предлагаются частицы, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, которые содержат опухолеассоциированный антиген, для индуцирования Т-клеточного ответа, такого как, цитотоксический CD4 или CD8 Т-клеточный ответ, для лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, субъекту предлагаются частицы, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, которые содержат антиген инфекционного заболевания, для индуцирования Т-клеточного ответа, такого как, цитотоксический CD4 или CD8 Т-клеточный ответ или ответ антитела, для лечения или профилактики инфекционного заболевания. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, субъекту предлагаются частицы, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, которые содержат аутоантиген, для индуцирования толерогенного или Т-клеточного ответа для лечения аутоиммунного заболевания.

[00176] Пептидный антигенный конъюгат содержит пептидный антиген (А), необязательные N- и/или C-концевые удлинения (В1 и/или В2), необязательный Линкер (L), Частицу (Р) или гидрофобную молекулу (Н) и необязательную заряженную молекулу(ы) (С). Каждый из этих компонентов описан ниже и более подробно повсеместно.

Пептидный антиген (А)

[00177] Пептидный антиген (А) может представлять собой любой антиген, который является подходящим для индуцирования иммунного ответа у субъекта. Пептидный антиген (А) может применяться для индукции либо провоспалительного, либо толерогенного иммунного ответа, в зависимости от природы иммунного ответа, требуемого для применения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген, такой как, собственный антиген, неоантиген или опухолеассоциированный вирусный антиген (например, ВПЧ Е6/Е7). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой антиген инфекционного заболевания, такой как, пептид, полученный из белка, выделенного из вируса, бактерии, грибка или простейшего патогенного микроорганизма. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой пептид, полученный из аллергена или аутоантигена, который, как известно или предположительно, вызывает аллергические реакции или аутоиммунные заболевания.

[00178] Пептидный антиген (А) состоит из последовательности аминокислот или пептидного миметика, который может индуцировать иммунный ответ, такой как, Т-клеточный ответ или В-клеточный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) содержит аминокислоту или аминокислоты с посттрансляционной модификацией, неприродные аминокислоты или пептид-миметики. Пептидный антиген может представлять собой любую последовательность природных, неприродных или посттрансляционно модифицированных аминокислот, пептид-миметики или любую их комбинацию, которая имеет антиген или прогнозируемый антиген, то есть, антиген с Т-клеточным или В-клеточным эпитопом.

[00179] Иммуногенные композиции могут содержать, по меньшей мере, один другой пептидный антигенный конъюгат, каждый из которых имеет другую пептидную антигенную (А) композицию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат частицы, содержащие до 50 различных пептидных антигенных конъюгатов, каждый из которых имеет уникальную пептидную антигенную (А) композицию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат мозаичные частицы, которые содержат 20 различных пептидных антигенных конъюгатов. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат мозаичные частицы, которые содержат 5 различных пептидных антигенных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат 20 различных композиций из частиц, каждая из которых скопилась из уникального пептидного антигенного конъюгата (то есть, каждая частица содержит композицию одиночного пептидного антигенного конъюгата). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат 5 различных композиций из частиц, каждая из которых скопилась из уникального пептидного антигенного конъюгата (то есть, каждая частица содержит композицию одиночного пептидного антигенного конъюгата). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат композицию из одиночной частицы, состоящую из композиции одиночного пептидного антигенного конъюгата.

[00180] Длина пептидного антигена (А) зависит от специфического применения и обычно составляет от, примерно, 5 до, примерно, 50 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) содержит от, примерно, 7 до 35 аминокислот, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот. В других вариантах

осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген представляет собой фрагмент полипептида. В других случаях, пептидный антиген представляет собой полноразмерный полипептид, такой как, белковый антиген, который может рекомбинантным образом экспрессироваться. Пептидные антигены (А) на основе опухолеассоциированных антигенов, антигенов инфекционных заболеваний, аллергенов или аутоантигенов могут быть доставлены в виде полноразмерной последовательности, однако, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, длиной не более 50 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) содержит от 7 до 35 аминокислот, обычно, примерно, 25. Таким образом, для опухолеассоциированного антигена, антигена инфекционного заболевания, аллергена или аутоантигена длиной более 25 аминокислот, например, антигена из 100 аминокислот, антиген может быть разделен на 7-35 аминокислот, например, пептидные антигены (А) из 25 аминокислот, при этом, каждый пептидный антиген (А) содержит уникальную композицию аминокислот; или, пептидные антигены (А) могут представлять собой перекрывающиеся пептидные пулы, при этом, антиген разделен на заданное количество аминокислот: от 7 до 35, например, пептидные антигены (А) из 25 аминокислот, которые имеют перекрывающиеся последовательности. Например, перекрывающийся пептидный пул, содержащий антиген из 100 аминокислот, может быть разделен на восемь пептидных антигенов (А) из 25 аминокислот, каждый из которых смещен на 12 аминокислот (то есть, каждый последующий пептид из 25 аминокислот, содержащий пептидную последовательность из 100 аминокислот, начинается в позиции 13-й аминокислоты от предыдущего пептида). Специалистам в данной области будет понятно, что существует множество перестановок для генерирования пептидного пула из антигена.

[00181] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой минимальный CD8 или CD4 Т-клеточный эпитоп, который содержит участки опухолеассоциированного антигена, антигена инфекционного заболевания, аллергена или аутоантигена, которые являются прогнозируемыми *in silico* (или измеряются эмпирически) для связывания молекул МНС-I или МНС-II. Для опухолеассоциированных антигенов, пептидный антиген (А), который представляет собой минимальный CD8 или CD4 Т-клеточный эпитоп, который является прогнозируемым *in silico* (или измеряется эмпирически) для связывания молекул МНС-I или МНС-II, также должен представлять собой последовательность аминокислот, являющуюся уникальной для опухолевой клетки. Алгоритмы прогнозирования связывания МНС-I или МНС-II –широко доступны (см. Ландегор и др., *Nucleic Acids Res.*,

36:W509-W512, 2008 и <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>). В некоторых вариантах осуществления индивидуализированной терапии по настоящему изобретению для конкретного субъекта (например, пациента), пептидный антиген (А), содержащий пептидный антигенный конъюгат, может содержать минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп из опухолиассоциированного антигена, антигена инфекционного заболевания, аллергена или аутоантигена, который обычно представляет собой пептид из 7-13 аминокислот, который, по прогнозам, обладает аффинностью связывания < 1000 нм для конкретного аллеля МНС-I, который экспрессируется этим субъектом. В некоторых вариантах осуществления индивидуализированной терапии по настоящему изобретению для конкретного субъекта (например, пациента), пептидный антиген (А) может содержать минимальный CD4 Т-клеточный эпитоп из опухолиассоциированного антигена, антигена инфекционного заболевания, аллергена или аутоантигена, который представляет собой пептид из 10-16 аминокислот, который, по прогнозам, обладает аффинностью связывания < 1000 нм для конкретного аллеля МНС-II, который экспрессируется этим субъектом. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, когда минимальный CD8 или CD4 Т-клеточный эпитоп не может быть идентифицирован для опухолиассоциированного антигена, антигена инфекционного заболевания, аллергена или аутоантигена, или когда опухолиассоциированный антиген, антиген инфекционного заболевания, аллерген или аутоантиген содержит несколько CD8 и CD4 Т-клеточных эпитопов, пептидный антиген (А) может содержать от 16 до 35 аминокислот, может содержать до 50 аминокислот, например, до 35 аминокислот, до 25 аминокислот или до 20 аминокислот, или до 16 аминокислот, таким образом, он может содержать все возможные CD8 или CD4 Т-клеточные эпитопы.

[00182] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) получен из опухолиассоциированных антигенов. Опухольассоциированные антигены могут представлять собой либо собственные антигены, которые присутствуют на здоровых клетках, но преимущественно экспрессируются опухолевыми клетками, либо неоантигены, которые представляют собой aberrantные белки, специфические для опухолевых клеток, и являются уникальными для конкретных пациентов. Подходящие собственные антигены включают антигены, которые преимущественно экспрессируются опухолевыми клетками, такие как, CLPP, Cyclin-A1, MAGE-A1, MAGE-C1, MAGE-C2, SSX2, XAgE1b/GAGED2a, Melan-A/MART-1, TRP-1, Тирозиназа, CD45, глипикан-3, IGF2B3, Калликреин 4, KIF20A, Lentsin, Meloe, MUC5AC, влияющие на общую выживаемость, простатическая кислая фосфатаза, NY-ESO-1 и MAGE-A3. Неоантигены возникают из-за врожденной генетической нестабильности

раковых заболеваний, которая может привести к мутациям в ДНК, вариантам сплайсинга РНК и изменениям в посттрансляционной модификации, и все они потенциально ведут к появлению *de novo* белковых продуктов, в совокупности именуемых неоантигенами или иногда прогнозируемыми неоантигенами. Мутации ДНК включают изменения в ДНК, включая несинонимичные миссенс-мутации, нонсенс-мутации, вставки, делеции, хромосомные инверсии и хромосомные транслокации, и все они потенциально ведут к появлению новых генных продуктов и, следовательно, неоантигенов. Изменения сайта сплайсинга РНК могут приводить к новым белковым продуктам, а миссенс-мутации могут вводить аминокислоты, разрешающие посттрансляционные модификации (например, фосфорилирование), которые могут быть антигенными. Кроме того, нестабильность опухолевых клеток может приводить к эпигенетическим изменениям и активации определенных факторов транскрипции, которые могут приводить к селективной экспрессии определенных антигенов опухолевыми клетками, которые не экспрессируются здоровыми, незлокачественными клетками.

[00183] Пептидные антигенные конъюгаты, применяемые в индивидуализированных противораковых вакцинах, должны включать пептидные антигены (А), которые содержат участки опухолеассоциированных антигенов, которые являются уникальными для опухолевых клеток. Пептидные антигены (А), содержащие неоантигены, возникающие в результате миссенс-мутации, должны охватывать изменение аминокислоты, кодируемой, по меньшей мере, одним нуклеотидным полиморфизмом. Пептидные антигены (А), содержащие неоантигены, возникающие в результате мутаций со сдвигом рамки, вариантов сайта сплайсинга, вставок, инверсий и делеций, должны охватывать новые пептидные последовательности и соединения новых пептидных последовательностей. Пептидные антигены (А), содержащие неоантигены с новыми посттрансляционными модификациями, должны включать аминокислоты, несущие посттрансляционную модификацию(и), такую как, фосфат или гликан. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) содержит 0-25 аминокислот с обеих боков, фланкирующих изменение аминокислоты или новое соединение, которое возникает вследствие мутации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой последовательность неоантигена, которая содержит 12 аминокислот с обеих боков, фланкирующих изменение аминокислоты, которое возникает в результате однонуклеотидного полиморфизма, например, пептид из 25 аминокислот, при этом, 13-я аминокислота представляет собой аминокислотный остаток, полученный в результате однонуклеотидного полиморфизма. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой последовательность неоантигена, которая содержит 12 аминокислот с обеих боков, фланкирующих аминокислоту с новой посттрансляционной модификацией, например, пептид из 25 аминокислот, при этом, 13-я аминокислота представляет собой аминокислотный остаток, полученный в результате нового сайта посттрансляционной модификации. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой последовательность неоантигена, которая содержит 0-12 аминокислот с обеих боков, фланкирующих новое соединение, созданное вставкой, делецией или инверсией. В некоторых случаях, пептидный антиген (А), содержащий неоантигены, полученные из новых последовательностей, может охватывать целиком новую последовательность, включающую 0-25 аминокислот с обеих боков новых соединений, которые также могут возникнуть.

[00184] Опухولةассоциированные антигены, подходящие в качестве пептидных антигенов (А) для иммуногенных композиций по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы посредством различных методов, которые известны специалисту в данной области техники. Опухولةассоциированные антигены могут быть идентифицированы посредством оценки экспрессии белка в опухолевых клетках, в сравнении со здоровыми клетками, то есть, незлокачественными клетками, полученными от субъекта. Подходящие способы оценки экспрессии белка включают, но этим не ограничиваются, иммуногистохимию, иммунофлуоресценцию, вестерн-блоттинг, хроматографию (то есть, эксклюзионную хроматографию), ELISA, проточную цитометрию и масс-спектрометрию. Белки, преимущественно экспрессируемые опухолевыми клетками, а не здоровыми клетками или ограниченным количеством здоровых клеток (например, CD20), являются подходящими опухолеассоциированными антигенами. Секвенирование ДНК и РНК биопсий опухоли пациента с последующей биоинформатикой для выявления мутаций в кодирующей белок ДНК, которые экспрессируются в виде РНК и продуцируют пептиды, которые, по прогнозам, будут связываться с аллелями МНС-I или МНС-II на антигенпрезентирующих клетках пациента (АРС), также может быть применено для идентификации опухолеассоциированных антигенов, которые подходят в качестве пептидных антигенов (А) для иммуногенных композиций по настоящему изобретению.

[00185] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, опухолеассоциированные антигены, подходящие в качестве пептидных антигенов (А) для иммуногенных композиций, идентифицируют с применением масс-спектрометрии. Подходящие пептидные антигены (А) представляют собой пептиды, идентифицированные

масс-спектрометрией после элюции из молекул МНС из биопсий опухоли пациента, а не из здоровых тканей того же субъекта (то есть, пептидные антигены присутствуют только в опухолевых клетках, а не в здоровых клетках того же субъекта). Масс-спектрометрия может применяться отдельно или в комбинации с другими методами для идентификации опухолеассоциированных антигенов. Специалистам в данной области техники будет понятно, что существует множество способов идентификации опухолеассоциированных антигенов, таких как, неоантигены (см. Ядав и др., Nature, 515:572-576, 2014), которые подходят в качестве пептидных антигенов (А) для практического применения настоящего изобретения.

[00186] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, опухолеассоциированные антигены, применяемые в качестве пептидных антигенов (А), являются клональными или почти клональными в пределах популяции непластических клеток, которые могут считаться гетерогенными во всех других случаях.

[00187] Опухлеассоциированные антигены, выбранные для применения в качестве пептидных антигенов (А) в индивидуализированных схемах противораковой вакцинации, могут быть выбраны на основании масс-спектрометрического подтверждения связывания пептида с МНС и/или прогнозируемой *in silico* аффинности связывания МНС и уровней экспрессии РНК в пределах опухолей. Эти данные предоставляют информацию о том, экспрессирован и презентируван ли опухолеассоциированный антиген опухолевыми клетками и, следовательно, будет ли он подходящей мишенью для Т-клеток. Такие критерии могут быть применены для выбора пептидных антигенов (А), применяемых в индивидуализированной противораковой вакцине.

[00188] Индивидуализированные противораковые вакцины на основе иммуногенных композиций могут содержать, по меньшей мере, один другой пептидный антигенный конъюгат, каждый из которых имеет уникальную пептидную антигенную (А) композицию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, индивидуализированные противораковые вакцины могут содержать 10-50 различных композиций пептидного антигенного конъюгата, каждая из которых имеет уникальный пептидный антиген (А). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат 20 различных пептидных антигенных конъюгатов, каждый из которых содержит пептидные антигены (А) длиной от 7 до 35 аминокислот, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот, как правило, не более 50. В неограничивающем примере, иммуногенные композиции, состоящие из частиц, образованных из 20 различных пептидных антигенных конъюгатов, состоящих из

пептидных антигенов (А) длиной 8 аминокислот, применяются в качестве индивидуализированной противораковой вакцины. В другом неограничивающем примере, иммуногенные композиции, состоящие из частиц, образованных из 20 различных пептидных антигенных конъюгатов, состоящих из пептидных антигенов (А) длиной 25 аминокислот, применяются в качестве индивидуализированной противораковой вакцины.

[00189] Для пациентов с высокомутированными опухолями, у которых имеется более 50 опухолеассоциированных неоантигенов, процесс выбора методом сокращения может быть применен для выбора пептидных антигенов (А) для применения в индивидуализированных противораковых вакцинах, состоящих из пептидных антигенных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, процесс выбора методом сокращения применяется для выбора пептидных антигенов (А), содержащих эпитопы, которые, по прогнозам, имеют наивысшую аффинность связывания с МНС и уровнями экспрессии РНК в опухолевых клетках. Дополнительные критерии могут применяться для выбора опухолеассоциированных собственных антигенов или неоантигенов. Например, прогнозируемая иммуногенность или прогнозируемая способность пептидного антигена (А) приводить к Т-клеткам, вступающим в реакцию с другими собственными антигенами, которые могут привести к аутоиммунным заболеваниям, являются дополнительными рассматриваемыми критериями. Например, пептидные антигены (А), которые содержат опухолеассоциированные антигены и обладают высокой прогнозируемой иммуногенностью, но также и низким потенциалом, приводящим к аутоиммунным заболеваниям, являются критериями, применяемым для выбора потенциальных пептидных антигенов (А) для применения в индивидуализированных противораковых вакцинах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, неоантигены, которые, как ожидается, должны приводить к Т-клеточным ответам или ответам антител, которые вступают в реакцию с собственными антигенами, обнаруженными на здоровых клетках, не выбраны для применения в качестве пептидных антигенов (А). Для пациентов с менее чем, например, 20-50 прогнозируемых неоантигенов, процесс выбора методом сокращения может быть не критичным, и поэтому все 20-50 прогнозируемых неоантигенов могут применяться в качестве пептидных антигенов (А) в индивидуализированной противораковой вакцине.

[00190] Противораковые вакцины могут включать пептидные антигены (А), которые содержат опухолеассоциированные антигены, которые являются специфическими для пациентов, и/или опухолеассоциированные агенты, которые являются общими для пациентов. Например, опухолеассоциированный антиген может представлять собой консервативный собственный антиген, такой как, NY-ESO-1

(тестикулярный рак) или gp100 (меланома), или антиген может представлять собой криптический эпитоп, такой как Na17 (меланома), который обычно не экспрессируется здоровыми клетками, но является консервативным для пациентов. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут включать пептидные антигены (А), которые возникают в результате так называемых мутаций горячих точек, которые являются частыми мутациями в определенных генах или областях генов, которые встречаются чаще, чем при случайном прогнозировании. Неограничивающие примеры мутаций горячих точек включают мутацию V600E в белке BRAF, которая является общей для меланомы, папиллярной карциномы щитовидной железы и колоректальной карциномы, или мутации KRAS G12, которые являются одними из наиболее распространенных мутаций, таких как, KRAS G12C. Целый ряд подходящих собственных антигенов, а также неоантигенов, которые возникают в результате мутаций горячих точек, известны и включены в настоящий документ в качестве ссылки: см. Чанг и др., *Nature Biotechnology*, 34: 155-163, 2016; Виньерон, Н., и др., *Cancer Immunology*, 13: 15-20, 2013.

[00191] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) может быть получен из гематологической опухоли. Неограничивающие примеры гематологических опухолей включают лейкозы, в том числе острые лейкозы (такие как, 11q23-положительный острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластная, промиелоцитарная, миеломоноцитарная, моноцитарная и эритролейкоз), хронический лейкоз (такой как, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинная полицитемия, лимфома, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома (невыраженные и высокодифференцированные формы), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазия.

[00192] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) может быть получен из солидного образования. Неограничивающие примеры солидных опухолей, таких как виды саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому и другие виды саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфолейкоз, рак поджелудочной железы, рак молочной железы (включая базальную карциному молочной железы, дуктальную карциному и лобулярную карциному молочной железы), виды рака легких, рак яичников, рак простаты, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную

карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомную карциному слюнной железы, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному жёлчного протока, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря и опухоли ЦНС (такие как, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, гемангиомы, меланома, нейробластома и ретинобластома). В некоторых примерах, опухоль представляет собой меланому, рак легких, лимфому молочной железы или рак толстой кишки.

[00193] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака молочной железы, такого как, дуктальная карцинома или лобулярная карцинома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака простаты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака кожи, такого как, базальноклеточная карцинома, саркома Капоши или меланома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака легких, такого как, аденокарцинома, бронхиолаволярная карцинома, крупноклеточная карцинома или мелкоклеточная карцинома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака головного мозга, такого как, глиобластома или менингиома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака печени, такого как, гепатоцеллюлярная карцинома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из рака почки, такого как, почечно-клеточный карцинома. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген из тестикулярного рака.

[00194] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой опухолеассоциированный антиген, полученный из предраковых заболеваний, таких как, варианты карциномы *in situ* или интраэпителиальная неоплазия вульвы, интраэпителиальная неоплазия шейки матки или интраэпителиальная неоплазия влагалища.

[00195] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой антиген из инфекционного агента, такого как, вирус, бактерия или грибок. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой пептид или гликопептид, полученный из инфекционного агента; например, пептид слияния оболочки ВИЧ или гликопептид V3 или V1/V2 из ВИЧ.

[00196] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) представляет собой аутоантиген. Антимутаген может быть идентифицирован и выбран на основе скрининга собственных Т-клеток субъекта на аутореактивность против аутоантигенов, представленных в контексте собственных молекул МНС-I пациента. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены могут быть выбраны с применением способов *in silico* для прогнозирования потенциальных аутоантигенов, которые (i) имеют прогнозируемую высокую аффинность для связывания собственных молекул МНС-I субъекта и (ii) экспрессируются, и/или о которых известно, что они ассоциированы с патологией, учитывающей аутоиммунный синдром субъекта. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген представляет собой эпитоп CD4, полученный из аллергена, и выбран на основе пептидного антигена, обладающего высокой аффинностью связывания для собственных МНС-II молекул пациента.

[00197] Специалистам в данной области техники будет понятно, что любой пептид, белок или посттрансляционно модифицированный белок (например, гликопротеин), который приводит к иммунному ответу, и который подходит для профилактики или лечения заболевания, может быть выбран для применения в качестве пептидного антигена (А) для применения в иммуногенных композициях по настоящему изобретению.

Удлинения (В1 и В2):

[00198] Дополнительные N- и C-концевые удлинения (В1 и В2) обозначают молекулы, сцепленные с N- и C-концом пептидного антигена (А), соответственно. N- и C-концевые удлинения В1 и В2 могут состоять из, по меньшей мере, одного из следующих:

аминокислоты, включая неприродные аминокислоты; гидрофильные этиленоксидные мономеры (например, PEG); гидрофобные алкановые цепи; или тому подобное; или из их комбинаций. N- и C-концевые удлинения B1 и B2 сцеплены с пептидным антигеном (A) любыми подходящими механизмами, например, посредством стабильных амидных связей.

[00199] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и B2) функционируют для контроля скорости деградации пептидного антигена (A), но они могут выполнять и любую, по меньшей мере, одну дополнительную функцию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N- и C-концевое удлинение (B1 или B2) может быть свободным (при этом, один конец N- или C-концевого удлинения сцеплен с пептидным антигеном (A), а другой конец не сцеплен с другой молекулой) и служат для замедления деградации пептидного антигена; например, удлинение на основе пептида B1 может быть сцеплено с N-концом пептидного антигена посредством амидной связи для замедления деградации. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N- и C-концевые удлинения (B1 и/или B2) могут быть сцеплены с гетерологичной молекулой и могут функционировать в качестве линкера, а также модулировать деградацию пептидного антигена (A). N- и/или C-концевые удлинения, предлагающие функцию линкера, могут сцеплять пептидный антиген либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L), с частицей (P) или с гидрофобной молекулой (H), и/или с заряженной молекулой (C).

[00200] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) функционируют для обеспечения расстояния, то есть, пространства, между любыми двумя гетерологичными молекулами. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) функционируют для придания пептидному антигенному конъюгату гидрофобных или гидрофильных свойств. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, композиция удлинений (B1 и/или B2) может быть выбрана для придания жесткости или гибкости. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N- или C-концевые удлинения (B1 и/или B2) могут способствовать стабилизации частиц, образованных пептидным антигенным конъюгатом.

[00201] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (B1 и/или B2) состоят из заряженных функциональных групп, например, заряженных аминокислотных остатков (например, аргинина, лизина), которые придают электростатический заряд при физиологической норме pH. Количество заряженных остатков, присутствующих в удлинении, можно применять для модуляции суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата. В настоящем документе раскрыт алгоритм,

который описывает систематический процесс выбора удлинений на основе пептидов (B1 и/или B2), которые распознаются протеазами и придают определенный электростатический заряд, который функционирует для стабилизации частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами.

[00202] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевые удлинения (B2), добавленные к пептидным антигенам (A), выбирают для облегчения изготовления пептидов, содержащих [C]-[B1]-A-B2-[X1], при этом, [] обозначает, что группа является необязательной, путем включения аминокислотных последовательностей в B2, которые нарушают образование β -листов и предотвращают усечение последовательности во время твердофазного пептидного синтеза. В неограничивающем примере, С-концевой дипептидный линкер (B2), Gly-Ser, включен во время твердофазного пептидного синтеза в виде дипептида-псевдопролина (например, Gly-Ser(Psi(Me,Me)pro)). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пролин включен в последовательность с С-концевым удлинением (B2), расщепляемым катепсином, например, Ser-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 21); при этом, пролин включен как для облегчения изготовления, так и для стимуляции процессинга удлинения эндосомальными протеазами.

[00203] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен на С-конце с удлинением B2, которое сцеплено либо непосредственно, либо опосредовано, посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (H) или с Частицей (P). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинение B1 сцеплено с N-концом пептидного антигена, а удлинение B2 сцеплено с С-концом пептидного антигена (A), при этом, либо B1, либо B2 сцеплены либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен на N-конце с удлинением B2, которое сцеплено либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) сцеплена с удлинением B1 или B2, которое сцеплено с N- или С-конце пептидного антигена (A), соответственно, при этом, удлинение, которое не сцеплено с заряженной молекулой (C), сцеплено либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженные молекулы (C) сцеплены как с удлинением B1, так и с удлинением B2, которые сцеплены как с N-, так и С-концами пептидного антигена (A), соответственно. В дополнительных вариантах осуществления

настоящего изобретения, заряженные молекулы (С) сцеплены с удлинением В1, сцепленным с N-концом пептидного антигена (А), но не с удлинением В2, присоединенным к С-концу пептидного антигена (А), который может быть сцеплен либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (Н) или с Частицей (Р). Предшественник линкера Х1 или Линкер (L) может быть сцеплен с любым из удлинений (В1 или В2) любыми подходящими механизмами, таким как, амидная связь. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинения (В1 и В2) представляют собой пептидные последовательности, выбранные для распознавания и гидролиза ферментами, такими как, протеазы. Удлинения (В1 и В2), в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, представляют собой расщепляемые пептиды, включая аминокислоты, распознаваемые любыми или всеми из перечисленного: эндосомальными протеазами или иммуно-протеасомой.

[00204] Как описано более подробно в настоящем документе, композиция удлинений (В1 или В2), состоящих из разлагаемых пептидов, зависит от того, сцеплено ли удлинение с N-концом (В1) или С-концом (В2) пептидного антигена (А).

[00205] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (В1) представляет собой пептидную последовательность длиной, примерно, от 1 до 8 аминокислот, такую как, длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот, обычно не более 10 аминокислот, которая сцеплена с пептидным антигеном (А) посредством, например, амидной связи, образованной между карбоксильной группой удлинения (В1) и альфа-амином остатка N-конца пептидного антигена (А). Амидная связь между В1 и пептидным антигеном (А) может расщепляться ферментами. Понятно, что положения аминокислот обычно нумеруют по порядку, от проксимального к дистальному положению от сайта расщепления, при этом, С-концевые положения аминокислоты относительно сайта расщепления обозначают простым символом (например, Pn'). Например, в отношении удлинения тетрапептида (PN4-PN3-PN2-PN1), сцепленного с N-концом пептидного антигена (А), который представляет собой октапептид (PA1'-PA2'-PA3'-PA4'-PA5'-PA6'-PA7'-PA8'), например, PN4-PN3-PN2-PN1-PA1'-PA2'-PA3'-PA4'-PA5'-PA6'-PA7'-PA8', амидная связь между PN1-PA1' распознается и гидролизуется ферментом.

[00206] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (В1) представляет собой разлагаемый ферментом тетрапептид, который распознается эндосомальными протеазами, при этом, положение PN1 удлинения тетрапептида (например, PN4-PN3-PN2-PN1), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбрано из аргинина, лизина, цитруллина,

глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина, например, PN4-PN3-PN2-Arg; PN2 выбрано из глицина, валина, лейцина или изолейцина; PN3 выбрано из глицина, серина, аланина, пролина или лейцина; и PN4 выбрано из глицина, серина, аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (B1) представляет собой разлагаемый ферментом трипептид, который распознается эндосомальными протеазами, при этом, положение PN1 удлинения трипептида (например, PN3-PN2-PN1), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбрано из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина; PN2 выбрано из глицина, валина, лейцина или изолейцина; и PN3 выбрано из глицина, серина, аланина, пролина или лейцина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (B1) представляет собой разлагаемый ферментом дипептид, который распознается эндосомальными протеазами, при том, положение PN1 удлинения дипептида (например, PN2-PN1), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбрано из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина; и PN2 выбрано из глицина, валина, лейцина или изолейцина. В других дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (B1) представляет собой аминокислоту, которая распознается эндосомными протеазами, при этом, положение PN1, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбрано из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина.

[00207] В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (B1) представляет собой пептид, разлагаемый ферментом, который распознается иммуно-протеасомой, при этом, положение P1 удлинения тетрапептида (PN4-PN3-PN2-PN1), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, выбрано из изолейцина, лейцина, норлейцина или валина, например, PN4-PN3-PN2-Leu.

[00208] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, N-концевое удлинение (B1) представляет собой разлагаемый ферментом пептид, который распознается как эндосомальными протеазами, так и иммуно-протеасомой, при этом, положения PN5 и PN1 удлинения октапептида (PN8-PN7-PN6- PN5-PN4-PN3-PN2-PN1) выбраны из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина для положения PN5, распознаваемого катепсинами, и из изолейцина, лейцина, норлейцина или валина для положения PN1, распознаваемого иммуно-протеасомой; например, PN8-PN7-PN6-Arg-PN4-PN3-PN2-Leu. Неограничивающим примером N-

концевого удлинения (B1), распознаваемого катепсинами и иммуно-протеасомой, является Lys-Pro-Leu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Leu (SEQ ID NO: 3).

[00209] Неограничивающие примеры тетрапептидных N-концевых удлинений (B1), которые распознаются иммуно-протеасомой, включают: Ser-Leu-Val-Cit, Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 4), Ser-Pro-Val-Cit, Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 5), Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 6), Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 8), Lys-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 9), Glu-Leu-Val-Cit, Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 10), Glu-Pro-Val-Cit и Lys-Pro-Val-Cit. Неограничивающие примеры трипептидных N-концевых удлинений (B1) включают: Leu-Val-Cit, Leu-Val-Leu, Pro-Val-Cit, Leu-Val-Arg, Pro-Val-Arg, Pro-Leu-Arg, Gly-Val-Ser. Неограничивающие примеры дипептидных N-концевых удлинений (B1) включают: Val-Cit, Val-Leu, Val-Arg, Leu-Arg. Неограничивающие примеры N-концевых удлинений одиночной аминокислоты (B1) включают: Cit, Arg, Leu или Lys. В приведенных выше примерах Arg можно заменить на Lys; Lys можно заменить на Arg; Glu можно заменить на Asp; а Asp можно заменить на Glu. Следует отметить, что Cit = цитруллин.

[00210] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, удлинение (B2) представляет собой разлагаемый пептид, сцепленный с остатком С-конца пептидного антигена (A), и состоит из аминокислотных последовательностей, которые распознаются и гидролизуются определенными протеазами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение (B2) представляет собой пептидную последовательность длиной, примерно, от 1 до 8 аминокислот, такую как длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот, обычно не более 10 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение (B2) сцеплено с пептидным антигеном (A) посредством амидной связи, образованной между С-концевой карбоксильной группой пептидного антигена (A) и альфа-амином N-концевого остатка удлинения (B2). Амидная связь между B2 и пептидным антигеном (A) может расщепляться ферментами. Следует отметить, что обычно нумеруют аминокислотные положения по порядку от проксимального к дистальному положению от сайта расщепления, при этом, С-концевые положения аминокислоты относительно сайта расщепления обозначают простым символом (например, Pn'). Например, в отношении удлинения тетрапептида (PC1'-PC2'-PC3'-PC4'), сцепленного с С-концом октапептидного антигена (PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1), например, PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1-PC1'-PC2'-PC3'-PC4', амидная связь между PA1-PC1' распознается и гидролизует ферментом.

[00211] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевые удлинения (В2) представляют собой аминокислотные последовательности, которые выбраны для стимуляции распознавания иммуно-протеасомой и расщепления, и необязательного распознавания эндосомальными протеазами. Поскольку пептидные антигены (А) обычно содержат С-концевой остаток, например, лейцин, который стимулирует гидролиз иммуно-протеасомой, например, в амидной связи, проксимальной по отношению к С-концевому остатку пептидного антигена (А), то необходимо выбрать удлинения, сцепленные с С-концом пептидного антигена (А), для стимуляции распознавания иммуно-протеасомой и расщепления в амидной связи, проксимальной по отношению к С-концу пептидного антигена (А). Иммуно-протеасома отдает предпочтение небольшим, незаряженным аминокислотам в положении PC1', которое примыкает к С-концевой аминокислоте, PA1, пептидного антигена (А), например, к амидной связи между PA1-PC1'. Однако эндосомальные протеазы предпочитают объемные гидрофобные аминокислоты (например, лейцин, норлейцин, метионин или глутамин) и основные аминокислоты (то есть, аргинин и лизин). Следовательно, С-концевые удлинения могут быть выбраны для стимуляции распознавания любыми из перечисленного или обоими классами протеаз.

[00212] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) с последовательностью PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1 сцеплен с С-концевым пептидным удлинением (В2) с последовательностью PC1' ...PCn', при этом, n представляет собой целое число от 1 до 8, например, PA8-PA7-PA6-PA4-PA3-PA2-PA1-PC1'...PCn'. Композиция С-концевого удлинения (В2) зависит от длины применяемой последовательности удлинения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение, В2, представляет собой PC1' одиночной аминокислоты, выбранный из Gly, Ala, Ser, Arg, Lys, Cit, Gln, Thr, Leu, Nle или Met. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение, В2, представляет собой дипептид PC1'-PC2', при этом, PC1' выбран из Gly, Ala или Ser; а PC2' выбран из Gly, Ala, Ser, Pro, Arg, Lys, Cit, Gln, Thr, Leu, Nle, или Met. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение В2 представляет собой трипептид PC1'-PC2'-PC3', при этом, PC1' выбран из Gly, Ala или Ser; PC2' выбран из Gly, Ala, Ser или Pro; а PC3' выбран из Gly, Ser, Arg, Lys, Cit, Gln, Thr, Leu, Nle или Met.

[00213] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение, В2, представляет собой удлинение тетрапептида,

PC1'-PC2'-PC3'-PC4', при этом, PC1' выбран из глицина, аланина или серина; PC2' выбран из глицина, аланина, серина, пролина или лейцина; PC3' выбран из глицина, аланина, серина, валина, лейцина или изолейцина; а PC4' выбран из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение, B2, представляет собой пентапептид, PC1'-PC2'-PC3'-PC4'-PC5', при этом, PC1' выбран из глицина, аланина или серина; PC2' выбран из глицина, аланина, серина, пролина, аргинина, лизина, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты; PC3' выбран из глицина, аланина, серина, пролина или лейцина; PC4' выбран из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина; а PC5' выбран из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, С-концевое удлинение, B2, представляет собой гексапептид, PC1'-PC2'-PC3'-PC4'-PC5'-PC6', при этом, PC1' выбран из глицина, аланина или серина; PC2' выбран из глицина, аланина, серина или пролина; PC3' выбрано из глицина, серина, пролина, аргинина, лизина, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты; PC4' выбрано из пролина или лейцина; PC5' выбрано из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина; а PC6' выбрано из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина.

[00214] Неограничивающие примеры гексапептидных С-концевых удлинений (B2) включают Gly-Gly-Lys-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 11), Gly-Gly-Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 12), Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 13), Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Cit; Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Cit, Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 14), Gly-Gly-Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 15), Gly-Gly-Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 16). Неограничивающие примеры пентапептидных С-концевых удлинений (B2) включают Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 17), Gly-Ser-Leu-Val-Cit, Gly-Lys-Pro-Val-Cit, Gly-Lys-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 18), Gly-Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 19), Gly-Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 20). Неограничивающие примеры тетрапептидных С-концевых удлинений (B2) включают Ser-Leu-Val-Cit, Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 4), Ser-Pro-Val-Cit, Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 5), Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 6), Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 8), Glu-Leu-Val-Cit, Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 10), Glu-Pro-Val-Cit, Glu-Gly-Val-Cit. Неограничивающие примеры трипептидных С-концевых удлинений (B2) включают Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Arg, Gly-Ser-Leu, Gly-Ser-Cit, Gly-Pro-Gly, Gly-Pro-Arg, Gly-Pro-Leu, Gly-Pro-Cit. Неограничивающие примеры дипептидных С-концевых удлинений (B2) включают Gly-Ser, Gly-Pro, Val-Cit, Gly-Arg Gly-Cit. Неограничивающие

примеры С-концевых удлинений одиночной аминокислоты (В2) включают Gly, Ser, Ala, Arg, Lys, Cit, Val, Leu, Met, Thr, Gln или Nle. В приведенных выше примерах Arg можно заменить на Lys; Lys можно заменить на Arg; Glu можно заменить на Asp; а Asp можно заменить на Glu.

[00215] С-концевой линкер (В2), сцепленный с С-концом пептидного антигена (А), может быть выбран для распознавания (то есть, гидролиза) как иммуно-протеасомой, так и эндосомальными протеазами. В неограничивающем примере, пептидный антиген (А) с последовательностью PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1 сцеплен на С-конце с С-концевым удлинением тетрапептида (В2) с последовательностью PC1'-PC2'-PC3'-PC4', при этом, PC1' выбран из глицина, аланина или серина, а PC4' выбран из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина, например, Ser-P3-P2-Arg. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, антиген с последовательностью PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1 сцеплен на С-конце с С-концевым удлинением гексапептида (В2) с последовательностью PC1'-PC2'-PC3'-PC4'-PC5'-PC6', при этом, PC1' и PC2' выбраны из глицина, аланина, пролина или серина, а PC6' выбран из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина, например, Gly-Gly-PC3'-PC4'-PC5'-Arg. Ограничивающим примером С-концевого удлинения (В2), которое стимулирует процессинг как иммуно-протеасомой, так и катепсинами, которое сцеплено с С-концом пептидного антигена (А), является Gly-Gly-Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 12). Дополнительным неограничивающим примером С-концевого удлинения (В2), которое сцеплено на С-конце пептидного антигена (А), которое отдает предпочтение процессингу иммуно-протеасомой и катепсинами, является Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Cit или Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Cit.

Линкеры (L) и предшественники линкеров (X1 и X2)

[00216] Подмножество линкеров, которые выполняют специфическую функцию сайт-селективного связывания, то есть, соединения или сцепления пептидного антигена (А) с гидрофобной молекулой (Н) или Частицей (Р), именуется «Линкерами (L)». Линкер (L) образуется в результате реакции между предшественником линкера X1 и предшественником линкера X2. Например, предшественник линкера X1, который сцеплен непосредственно или опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2) или заряженной молекулы (С), с пептидным антигеном (А), может вступать в реакцию с предшественником линкера X2, присоединенным к гидрофобной молекуле (Н) или к Частице (Р) с образованием Линкера (L), который сцепляет пептидный антиген (А) с гидрофобной молекулой (Н) или Частицей (Р). Предшественник линкера X1 обеспечивает сайт-селективное сцепление пептидного антигена (А) с Частицей (Р) или гидрофобной

молекулой (H). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A), сцепленный либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2), с предшественником линкера X1, может быть продуцирован и выделен, а затем отдельно добавлен к Частице (P) или гидрофобной молекуле (H), которая содержит предшественник линкера X2, который селективно вступает в реакцию с образованием Линкера (L), соединяющего пептидный антиген (A) с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H).

[00217] Линкер (L) или предшественник линкера X1 может быть сцеплен с пептидным антигеном (A) либо на N- или C-конце пептидного антигена либо непосредственно, либо опосредованно, посредством N-концевого удлинения (B1) или C-концевого удлинения (B2), соответственно. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, Линкер (L) или предшественник линкера X1 сцеплен с пептидным антигеном (A) или удлинением (B1 или B2) посредством амидной связи. Следует отметить, что Линкер (L) или предшественник линкера X1, сцепленный непосредственно с N- или C-концом пептидного антигена, не считается удлинением.

[00218] Подходящими предшественниками линкера X1 являются предшественники, которые селективно вступают в реакцию с предшественниками линкера X2 на Частице (P) или гидрофобной молекуле (H) без сцеплений, происходящих в любом другом сайте пептидного антигена (A), или дополнительных удлинений (B1 и/или B2), или дополнительно заряженной молекулы (C). Эта селективность важна для обеспечения образования сцепления между пептидным антигеном (A) и Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H) без модификации пептидного антигена (A). Линкер (L) может сцеплять пептидный антиген (A), непосредственно или опосредованно, посредством удлинения (B1 или B2) с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H) посредством ковалентных и/или высокоаффинных взаимодействий. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 образует ковалентную связь с предшественником линкера X2 на Частице или гидрофобной молекуле (H).

[00219] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, Линкер (L) образуется в результате биоортогональной «клик-химической» реакции между предшественниками линкера X1 и X2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, клик-химическая реакция представляет собой бескатализаторную клик-химическую реакцию, такую как, стимулируемую штаммом реакцию азид-алкинового циклоприсоединения, которая не требует применения меди или какого-либо катализатора. Неограничивающие примеры предшественников линкера X1, которые допускают биоортогональные реакции, включают молекулы, содержащие функциональные группы,

выбранные из азидов, алкинов, тетразинов и транс-циклооктенов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1, содержащий азид, вступает в реакцию с предшественником линкера X2 с образованием триазольного Линкера. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1, содержащий тетразин, вступает в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим транс-циклооктен (ТСО), с образованием Линкера, содержащего продукт лигирования по Дильсу-Альдеру с обратными требованиями. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 представляет собой неприродную аминокислоту, несущую азидную функциональную группу, которая вступает в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим присутствующий алкин, который подвергается 1,3-диполярному циклоприсоединению с образованием стабильного триазольного кольца. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X2, сцепленный с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H), содержит алкин, который подвергается стимулированному штаммом циклоприсоединению, такой как, дибензоциклооктин (DBCO). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 представляет собой алкин, который вступает в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим азид, который присутствует на Частице (P) или гидрофобной молекуле (H).

[00220] В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественники линкеров X1, которые допускают сайт-селективную реактивность, в зависимости от композиции пептидного антигена (A), могут содержать функциональные группы, которые включают тиолы, гидразины, кетоны и альдегиды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1, содержащий тиол, вступает в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим пиридилдисульфид или малеимид, с образованием дисульфидного или тиоэфирного Линкера соответственно. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1, содержащий гидразин, вступает в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим кетон или альдегид, с образованием гидразинового Линкера. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 представляет собой природный или неприродный аминокислотный остаток с тиольной функциональной группой, такой как, цистеин, который вступает в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим реакционноспособную по отношению к тиолу функциональную группу, такую как, малеимид или пиридилдисульфид.

[00221] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 представляет собой пептидную последовательность, которая лигирована с другой пептидной последовательностью, содержащей предшественник линкера X2, предложенной на Частице (P) или гидрофобной молекуле (H). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 связывается с комплементарной молекулой, содержащей предшественник линкера X2 на Частице (P) или гидрофобной молекуле (H), посредством высокоаффинных, нековалентных взаимодействий, например, посредством суперспиральных взаимодействий или электростатических взаимодействий. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 связывается с белком, например, с биотином, который образует высокоаффинные взаимодействия с белком, например, со стрептавидином.

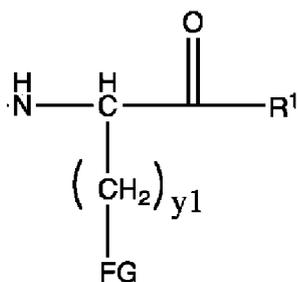
[00222] Специалисты в данной области техники будет понятно, что подходящие пары функциональных групп или комплементарных молекул, выбранных для предшественников линкера X1 и X2, могут быть транспозируемыми между X1 и X2. Например, линкер, состоящий из триазола, может быть образован из предшественников линкера X1 и X2, содержащих азид и алкин, соответственно, или из предшественников линкера X1 и X2, содержащих алкин и азид, соответственно. Таким образом, любая подходящая пара функциональных групп, приводящая к образованию Линкера, может быть помещена либо на X1, либо на X2.

[00223] Конкретные предшественники линкеров (X1 и X2) и Линкеры (L), представленные в этом изобретении, предлагают неожиданные улучшения технологичности изготовления и улучшения биологической активности. Многие такие предшественники линкера (X1 и X2) и Линкеры (L) могут подходить для практического применения настоящего изобретения и описаны более подробно повсеместно.

[00224] Предшественник линкера (X1) может быть присоединен либо к N-, либо к C-концу пептидного антигена (A) либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения (B1 или B2) или заряженной молекулы (C).

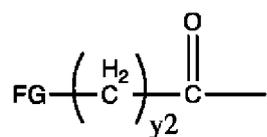
[00225] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 представляет собой аминокислоту, сцепленную с C-концом пептидного антигена (A) либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения B2 или заряженной молекулы (C), и имеет формулу:

при этом, функциональная группа (FG) выбрана для вступления в реакцию специфическим образом с FG на предшественнике линкера X2



и ее обычно выбирают из амина, азиды, гидразина или тиола; R^1 обычно выбирают из OH или NH_2 , а y_1 представляет собой любое целое число, такое как, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; и альфа-амин аминокислоты обычно сцеплен с C-концевой аминокислотой удлинения B2 или C-концевой аминокислотой пептидного антигена (A), если отсутствует удлинение B2.

[00226] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 сцеплен с N-концом пептидного антигена (A) либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения (B1 или B2) или заряженной молекулы (C), и имеет формулу:



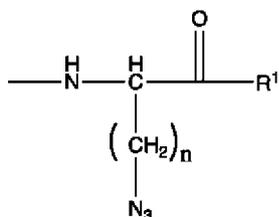
при этом, функциональную группу (FG) выбирают для вступления в реакцию с предшественником линкера X2 и обычно выбирают из амина, азиды, гидразина или тиола; y_2 представляет собой любое целое число, обычно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; а карбонил обычно сцеплен с альфа-амином N-концевой аминокислоты удлинения B1 или пептидного антигена (A), когда B1 отсутствует.

[00227] Предшественник линкера X2, предложенный на гидрофобной молекуле (H) или Частице (P), содержит функциональную группу, которая выбрана для обеспечения селективной реакции с предшественником линкера X1 с образованием Линкера (L). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, функциональные группы, содержащие X2, включают карбонилы, такие как, активированные эфиры/карбоновые кислоты или кетоны, которые вступают в реакцию с аминами или гидразинами, предложенными на предшественнике линкера X1, с образованием Линкеров (L), содержащих амид или гидразон. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, функциональные группы, содержащие X2, включают азиды, которые вступают в реакцию с алкинами, предложенными на предшественнике линкера X1, с образованием триазолов. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, функциональная группа, содержащая X2, выбрана из малеимидов или дисульфидов,

которые вступают в реакцию с тиолами, предложенными на предшественнике линкера X1, с образованием Линкеров (L), содержащих тиоэферы или дисульфиды. Предшественник линкера X2 может быть присоединен к гидрофобной молекуле (H) или Частице (P) любыми подходящими механизмами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) содержит пептид, и X2 сцеплен с N-концом гидрофобной молекулы на основе пептида (H).

[00228] Линкер (L) может содержать триазол, образованный между предшественниками линкера X1 и X2, содержащими азид и алкин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Линкер, содержащий триазол, получают в результате реакции азидосодержащего предшественника линкера X1 и алкин(например, циклооктин)-содержащего предшественника линкера X2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, азидосодержащий предшественник линкера X1 представляет собой неприродную аминокислоту, несущую азидную функциональную группу, которая сцеплена с N-концом пептидного антигена (A) или удлинением (B1) или с C-концом пептидного антигена (A) или удлинением (B2). Азидная функциональная группа предлагает реакционноспособную ручку, которая сцеплена либо непосредственно с пептидным антигеном (A), либо опосредованно, посредством N-концевого удлинения (B1) или C-концевого удлинения (B2), и селективно вступает в реакцию с алкином (например, циклооктином), содержащим предшественник линкера X2, который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P), образуя, тем самым, триазольный Линкер (L), который соединяет пептидный антиген (A) с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P).

[00229] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 представляет собой азидоаминокислоту, сцепленную с C-концом пептидного антигена (A) либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения B2 или заряженной молекулы (C), и имеет формулу:

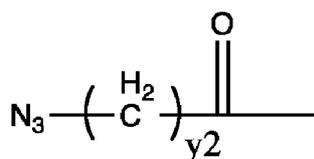


при этом, альфа-амин аминокислоты сцеплен с C-концевой аминокислотой B2 или пептидным антигеном (A), если отсутствует удлинение B2; R¹ выбран из OH или NH₂, а n представляет собой любое целое число, такое как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Неограничивающими примерами азидосодержащих предшественников линкера X1 являются 5-азидо-2-

аминопентановая кислота, 4-азидо-2-аминобутановая кислота и 3-азидо-2-аминопропановая кислота.

[00230] В других вариантах осуществления настоящего изобретения, когда азидосодержащий предшественник линкера X1 сцеплен с N-концевым удлинением (B1) или непосредственно с N-концом пептидного антигена (A), когда B1 отсутствует, предшественник линкера X1 имеет формулу:

при этом, карбонил обычно сцеплен с альфа-амином N-концевой аминокислоты удлинения



B1 или пептидного антигена (A), когда B1 отсутствует; а y_2 представляет собой любое целое число, обычно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Неограничивающие примеры азидосодержащих предшественников линкеров включают 6-азидогексановую кислоту, 5-азидопентановую кислоту, 4-азидобутановую кислоту и 3-азидопропановую кислоту.

[00231] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, предшественник линкера X1 содержит азид, предшественник линкера X2 содержит фрагмент алкина. Неограничивающие примеры алкинов включают алифатические алкины, циклооктины, такие как, дибензилциклооктин (DBCO или DIBO), дифтороктин (DIFO) и биарилазациклооктинон (BARAC). В некоторых частных вариантах осуществления настоящего изобретения, алкинсодержащий предшественник линкера X2 включает молекулу DBCO.

[00232] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, C-концевое удлинение (B2) сцеплено с пептидным антигеном (A) посредством амидной связи на C-конце пептидного антигена (A), который, в свою очередь, сцеплен посредством Линкера (L) с гидрофобным блоком (H). Примером такого пептидного антигенного конъюгата, сцепленного с C-концом, является $(A)_{7-35}$ -B2-L-H, где $(A)_{7-35}$ представляет собой пептидный антиген, содержащий от 7 до 35 аминокислот. В неограничивающем примере, пептидный антиген (A) с октапептидной последовательностью PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1 сцеплен на C-конце с удлинением тетрапептида (B2), например, Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), которое сцеплено с азидо-лизином азидосодержащего предшественника линкера (X1) (6-азидо 2-аминогексановая кислота, Lys(N3)), который, в свою очередь, вступает в реакцию с фрагментом дибензоциклооктина (DBCO)

циклооктинсодержащего предшественника линкера (X2), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) для продуцирования PA8-PA7-PA6-PA5-PA4-PA3-PA2-PA1-Ser-Leu-Val-Arg-Lys(N3-DBCO-H).

[00233] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен с N-концевым удлинением (B1) на N-конце пептидного антигена (A), который, в свою очередь, сцеплен посредством Линкера (L) с гидрофобным блоком (H). В неограничивающем примере, пептидный антиген с последовательностью PA1'-PA2'-PA3'-PA4'-PA5'-PA6'-PA7'-PA8' сцеплен на N-конце с удлинением тетрапептида (PN4-PN3-PN2-PN1), например, Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), которое сцеплено с азидопентановой кислотой (Azp), которая, в свою очередь, вступает в реакцию с фрагментом дибензоциклооктина (DBCO) циклооктинсодержащего предшественника линкера (X2), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H): H-DBCO-Azp-Ser-Leu-Val-Arg-PA1'-PA2'-PA3'-PA4'-PA5'-PA6'-PA7'-PA8'.

Другие линкеры и сцепления

[00234] Линкеры обычно относятся к любым молекулам, которые соединяют любые, по меньшей мере, две гетерологичные молекулы пептидного антигенного конъюгата и могут дополнительно выполнять любую, по меньшей мере, одну функцию из следующих: I) увеличивать или уменьшать растворимость в воде; II) увеличить расстояние между любыми двумя компонентами, то есть, гетерологичными молекулами пептидного антигенного конъюгата; III) придавать жесткость или гибкость; или IV) контролировать / модулировать скорость деградации / гидролиза сцепления между любыми, по меньшей мере, двумя гетерологичными молекулами. Специфические типы линкеров, применяемые в настоящем документе, названы. Линкеры (L) представляют собой специфический тип линкерной молекулы, применяемой для сайт-специфического сцепления пептидного антигена (A) с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H) либо непосредственно, либо опосредовано, посредством удлинения (B1 или B2) Следует отметить, что N- и C-концевые удлинения, B1 и B2, помещенные на N- и C-конце пептидного антигена (A), соответственно, могут быть сцеплены с гетерологичной молекулой, такой как, заряженная молекула (C), Линкер (L), Частица (P) или гидрофобная молекула (H), или любая гетерологичная молекула, и, следовательно, функционируют как линкер. Для ясности, хотя любая молекула, помещенная на N- или C-конце пептидного антигена (A), представляет собой N- или C-концевое удлинение (B1 или B2), удлинение также может служить в качестве линкера, когда оно сцеплено с другой молекулой, например, с заряженной молекулой (C). Таким образом, как определено в настоящем

документе, линкер на N- или C-конце антигена всегда представляет собой удлинение (B1 или B2), но удлинение не всегда представляет собой линкер.

[00235] Линкеры, применяемые для соединения любых двух компонентов пептидного антигенного конъюгата, например, пептидного антигена (A), сцепленного с гидрофобной молекулой (H), опосредованно, посредством удлинения (B1 или B2), могут быть получены любыми подходящими механизмами. Линкер может применять ковалентные или нековалентные механизмы для соединения любых, по меньшей мере, двух компонентов, то есть, гетерологичных молекул, например, пептидного антигена (A) и гидрофобной молекулы (H).

[00236] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер может соединять, то есть, сцеплять, любые два компонента пептидного антигенного конъюгата посредством ковалентной связи. Ковалентные связи являются предпочтительными сцеплениями, применяемыми для соединения любых двух компонентов, то есть, гетерологичных молекул пептидного антигенного конъюгата и обеспечения того обстоятельства, чтобы ни один компонент не был способен немедленно диспергироваться из других компонентов, например, пептидный антиген и гидрофобная молекула (H) после введения субъекту. Кроме того, ковалентные сцепления обычно предлагают большую стабильность, по сравнению с нековалентными сцеплениями, и помогают обеспечить то обстоятельство, чтобы каждый компонент пептидного антигенного конъюгата совместно доставлялся в антигенпрезентирующие клетки в пропорциях каждого введенного компонента или близко к этим пропорциям.

[00237] В неограничивающем примере ковалентного сцепления, клик-химическая реакция может привести к получению триазола, который сцепляет, то есть, соединяет любые два компонента пептидного антигенного конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, клик-химическая реакция представляет собой стимулированную штаммом [3+2] реакцию азид-алкинового циклоприсоединения. Алкиновая группа и азидная группа могут быть предложены на соответствующих молекулах, содержащих пептидный антигенный конъюгат, которые должны быть сцеплены «клик-химией». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, лиганд, такой как, агонист TLR, несущий азидную функциональную группу, связан с гидрофобной молекулой (H), имеющей соответствующую реакционноспособную группу, такой как, алкин, например, дибензилциклооктин (DBCO). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1, несущий тиоловую функциональную группу, сцеплен либо непосредственно, либо посредством N- или C-концевого удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A). Тиол может быть

сцеплен с гидрофобной молекулой (Н), имеющей соответствующую реакционноспособную группу, такую как, алкин, алкен, малеимид, что приводит к тиоэфирной связи, или с тиолом может вступать в реакцию пиридилдисульфид, например, что приводит к дисульфидному сцеплению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, амин предложен на одной молекуле и может быть сцеплен с другой молекулой путем вступления в реакцию амина с любой подходящей электрофильной группой, такой как, карбоновые кислоты, хлорангидриды или активированные эфиры (например, N-гидроксисукцинимидный (NHS) эфир), что приводит к образованию амидной связи, или с амином могут вступать в реакцию алкены (посредством реакции присоединения Михаэля), альдегиды и кетоны (посредством основания Шиффа). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1, дополнительные N- и C-концевые удлинения (B1 и B2), дополнительная заряженная молекула (C) и пептидный антиген (A) сцеплены друг с другом посредством амидных связей в виде одиночной пептидной последовательности, продуцируемой твердофазным синтезом пептидов. Имеется целый ряд доступных подходящих реакций, которые приводят к ковалентной связи, то есть, к связи, которая будет известна специалисту в данной области техники.

[00238] Тип линкера, применяемого для соединения любых, по меньшей мере, двух гетерологичных молекул, то есть, разных компонентов пептидного антигенного конъюгата, может быть выбран для выполнения специфических функций и удовлетворения специфическим требованиям применения. Как правило, линкер способен образовывать ковалентные связи между, по меньшей мере, двумя гетерологичными молекулами пептидного антигенного конъюгата, при этом, компоненты представляют собой пептидный антиген (A), Частицу (P) или гидрофобную молекулу (H), дополнительные N- и C-концевые удлинения (B1 и B2), дополнительный Линкер (L); дополнительную заряженную молекулу (C); дополнительный второй полимер (который сцеплен с гидрофобной молекулой (H)); и дополнительный Лиганд, такой как, агонист PRR.

[00239] Существует много подходящих линкеров, которые хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, но этим не ограничиваются, углеродные линкеры с прямой или разветвленной цепью, гетероциклические углеродные линкеры, жесткие ароматические линкеры, гибкие этиленоксидные линкеры, пептидные линкеры или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, углеродный линкер может включать алкановый линкер C1-C18, такой как, низший алкил C4; алкановые линкеры могут служить для увеличения пространства

между, по меньшей мере, двумя гетерологичными молекулами, тогда как алкановые линкеры с более длинной цепью могут применяться для придания гидрофобных характеристик. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, гидрофильные линкеры, такие как, этиленоксидные линкеры, могут применяться вместо алкановых линкеров, чтобы увеличить пространство между, по меньшей мере, любыми гетерологичными молекулами и увеличить растворимость в воде. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер может представлять собой ароматическое соединение или поли(ароматическое) соединение, которое придает жесткость. Молекула линкера может содержать гидрофильный или гидрофобный линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер включает разлагаемую пептидную последовательность, которая расщепляется внутриклеточным ферментом (таким как, катепсин или иммуно-протеасома).

[00240] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер может состоять из поли(этиленоксида) (PEG). Длина линкера зависит от цели линкера. Например, длина линкера, такого как, линкер PEG, может быть увеличена для разделения компонентов иммуногенной композиции, например, для уменьшения пространственного затруднения, или, в случае гидрофильного линкера PEG, может быть применена для улучшения растворимости в воде. Линкер, такой как, PEG, может представлять собой короткий линкер, длина которого может составлять, по меньшей мере, 2 мономера. Линкер, такой как, PEG, может иметь длину от, примерно, 4 до, примерно, 24 мономеров, например, длиной, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 мономера. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд сцеплен с гидрофобной молекулой (H) посредством линкера PEG.

[00241] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, где линкер содержит углеродную цепь, линкер может содержать цепь из, примерно, 1 или 2 и, примерно, 18 атомов углерода, такую как, длиной, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, где линкер содержит углеродную цепь, линкер может содержать цепь от, примерно, 12 до, примерно, 20 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, где линкер содержит углеродную цепь, линкер может содержать цепь, содержащую не более 18 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, такой как, агонист PRR, сцеплен с гидрофобной молекулой (H) посредством низшего алкила.

[00242] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер расщепляется в условиях внутриклеточной среды, в результате чего, расщепление линкера

приводит к высвобождению любого компонента, сцепленного с линкером, например, пептидного антигена.

[00243] Например, линкер может расщепляться ферментами, локализованными во внутриклеточных везикулах (например, в лизосоме, эндосоме или кавеолах), или ферментами в цитозоле, таком как, протеасома, или иммуно-протеасомой. Линкер может представлять собой, например, пептидный линкер, который расщепляется протеазными ферментами, включая, но не ограничиваясь этим, протеазы, которые локализуются во внутриклеточных везикулах, таких как, катепсины в лизосомальном или эндосомальном компартменте. Пептидный линкер обычно имеет длину 1-10 аминокислот, такую как, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (например, до 20) аминокислот, такую как, по меньшей мере, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислот. Известно, что определенные дипептиды гидролизуются протеазами, которые включают катепсины, такие как, катепсины В и D, и плазмин (см., например, Дубовчик и Уолкер, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Например, может быть применен пептидный линкер, который расщепляется тиолзависимой протеазой катепсином-В (например, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 23)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в Патенте США № 6,214,345, включенном в настоящий документ посредством ссылки. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, представляет собой линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, Патент США № 6,214,345, в котором описан синтез доксорубицина с линкером Val-Cit).

[00244] Конкретные последовательности расщепляемого пептида в линкере могут быть применены для стимуляции процессинга иммунными клетками после внутриклеточного поглощения. Например, несколько вариантов осуществления иммуногенных композиций, раскрытых в настоящем документе, образуют частицы в водных условиях, которые интернализуются иммунными клетками, такими как, антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки). Расщепляемый пептидный линкер может быть выбран для стимуляции процессинга (то есть, гидролиза) пептидного линкера после внутриклеточного поглощения иммунными клетками. Последовательность расщепляемого пептидного линкера может быть выбрана для стимуляции процессинга внутриклеточными протеазами, такими как, катепсины во внутриклеточных везикулах или протеасома, или иммуно-протеасома в цитозольном пространстве.

[00245] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкеры, состоящие из пептидных последовательностей формулы Pn...P4-P3-P2-P1, применяются

для стимуляции распознавания катепсинами, при этом, P1 выбран из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина; P2 выбрано из глицина, лейцина, валина или изолейцина; P3 выбрано из глицина, серина, аланина, пролина или лейцина; а P4 выбрано из глицина, серина, аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты. В неограничивающем примере, тетрапептидный линкер формулы P4-P3-P2-P1 сцеплен посредством амидной связи с гетерологичной молекулой и имеет последовательность Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 8). Для ясности, аминокислотные остатки (Pn) пронумерованы по порядку от проксимального к дистальному от сайта расщепления, который представляет собой С-конец относительно остатка P1, например, амидная связь между P1-P1' является гидролизованной. Подходящие пептидные последовательности, которые стимулируют расщепление эндосомальными и лизосомальными протеазами, такими как, катепсин, широко описаны в литературе (см.: Чхве, и др., *J. Biol. Chem.*, 281: 12824-12832, 2006).

[00246] В нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, линкеры, состоящие из пептидных последовательностей, выбирают для стимуляции распознавания протеасомой или иммуно-протеасомой. Пептидные последовательности формулы Pn...P4-P3-P2-P1 выбраны для стимуляции распознавания протеасомой или иммуно-протеасомой, при этом, P1 выбран из основных остатков и гидрофобных разветвленных остатков, таких как, аргинин, лизин, лейцин, изолейцин и валин; P2, P3 и P4, при необходимости, выбраны из лейцина, изолейцина, валина, лизина и тирозина. В неограничивающем примере, расщепляемый линкер формулы P4-P3-P2-P1, который распознается протеасомой, сцеплен, посредством амидной связи, в P1 с гетерологичной молекулой и имеет последовательность Tug-Leu-Leu-Leu (SEQ ID NO: 24). Последовательности, которые стимулируют деградацию протеасомой или иммуно-протеасомой, могут применяться отдельно или в комбинации с линкерами, расщепляемыми катепсинами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислоты, которые стимулируют иммуно-протеасомный процессинг, сцеплены с линкерами, которые стимулируют процессинг эндосомальными протеазами. Целый ряд подходящих последовательностей для стимуляции расщепления иммуно-протеасомой широко описан в литературе (см.: Клецель, и др., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2: 179-187), 2001, Хьюбер, и др., *Cell*, 148:727-738, 2012 и Харрис и др., *Chem. Biol*, 8: 1131-1141, 2001).

[00247] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, N- и C-концевые удлинения (B1 и B2), которые сцеплены с N- и C-концами пептидного антигена (A), соответственно, сцеплены с дополнительными молекулами, например, с

заряженной молекулой (С) и гидрофобной молекулой (Н), соответственно, и состоят из расщепляемых пептидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, расщепляемые пептидные удлинения помещены на любом или на обоих N- и/или С-концах пептидного антигена (А). Расщепляемые пептидные удлинения, помещенные на N-конце пептидного антигена (А), представляют собой N-концевые удлинения (В1), но могут дополнительно функционировать как линкеры, когда удлинение сцеплено с другой молекулой, например, с заряженной молекулой (С), кроме того, с пептидным антигеном. Удлинения, помещенные на С-конце пептидного антигена (А), представляют собой С-концевые удлинения (В2), но могут дополнительно функционировать как линкеры, когда удлинение сцеплено с другой молекулой, например, с гидрофобной молекулой (Н). Предпочтительные последовательности расщепляемых пептидов, содержащих линкеры либо на N-, либо на С-конце (В1 и В2), различны и описаны более подробно повсеместно.

[00248] В других вариантах осуществления настоящего изобретения, любые, по меньшей мере, два компонента пептидных антигенных конъюгатов могут быть соединены посредством рН-чувствительного линкера, который чувствителен к гидролизу в кислотных условиях. Специалистам в данной области техники известен целый ряд рН-чувствительных сцеплений, который включает, например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, амид цис-аконитовой кислоты, ортоэфир, ацеталь, кеталь или тому подобное (см., например, Патенты США №№ 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Дубовчик и Уолкер, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Невилл и др., 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, сцепление является стабильным при физиологической норме рН, например, при рН, составляющем, примерно, 7,4, но подвергается гидролизу при лизосомальном рН, ~ рН 5-6,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, такой как, агонист TLR-7/8, сцеплен с гидрофобной молекулой (Н) посредством FG, который образует рН-чувствительную связь, такую как, реакция между кетоном и гидразином с образованием рН-лабильной гидразоновой связи. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2), с предшественником линкера X1, который несет кетонную группу и сцеплен с предшественником линкера X2, содержащим гидразин на гидрофобной молекуле (Н). Преимущество рН-чувствительного сцепления, такого как, гидразон, состоит в том, что связь является стабильной при физиологической норме рН, при, примерно, рН 7,4, но гидролизуется при более низких значениях рН, таких как, рН внутриклеточных везикул.

[00249] В других вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер содержит сцепление, которое расщепляется при восстановительных условиях, таких как, восстанавливаемая дисульфидная связь. Многие различные линкеры, применяемые для введения дисульфидных связей, известны в данной области техники (см., например, Торп и др., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Вавжинчак и др., *Иммуноконъюгаты: Конъюгаты антител в радиоизображениях и терапии рака* (С.В. Фогель и др., Oxford U. Press, 1987); Филлипс и др., *Cancer Res.* 68:92809290, 2008). См. так же, Патент США № 4,880,935.). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2), с предшественником линкера Х1, который несет тиоловую функциональную группу, которая образует дисульфидную связь с предшественником линкера Х2, содержащим пиридилдисульфид, сцепленный с гидрофобной молекулой (Н).

[00250] В других дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, сцепление между любыми двумя компонентами пептидного антигенного конъюгата может быть образовано ферментативной реакцией, такой как, лигирование экспрессированного белка, или химии-ферментативными реакциями сортазы (см.: Физерер, и др., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111:W1176-1181, 2014 и Тайле и др., *Nat. Protoc.* 8: 1800-1807, 2013.) (Смит и др., *Bioconjug. Chem.*, 25: 788-795, 2014), или нековалентными высокоаффинными взаимодействиями, такими как, например, взаимодействия биотин-авидин и суперспиральные взаимодействия (Печар и др., *Biotechnol. Adv.*, 31:90-96, 2013), или любыми подходящими средствами, которые известны специалистам в данной области техники (см. Чалкер, и др., *Acc. Chem. Res.*, 44:730-741, 2011, Дюма, и др., *Agnew Chem. Int. Ed. Engl.*, 52:3916-3921, 2013).

Частица (Р) или гидрофобная молекула (Н):

[00251] Иммуногенные композиции по настоящему изобретению содержат пептидные антигенные конъюгаты, которые дополнительно содержат предварительно образованную Частицу (Р) или гидрофобную молекулу (Н). Пептидные антигенные конъюгаты, содержащие Частицу (Р), встречаются в виде частиц в водных условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобные молекулы (Н), могут встречаться в виде одиночных растворимых молекул в органических растворителях (например, DMSO), но скапливаются в частицы в водных условиях. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобные молекулы (Н), могут встречаться в виде одиночных растворимых молекул в органических растворителях (например, DMSO) и в водных условиях при определенных диапазонах температуры и рН,

но скапливаются в частицы в водных условиях при определенных диапазонах температуры и рН, например, при температуре и рН физиологической нормы.

[00252] Цель Частицы (P) или гидрофобной молекулы (H) состоит в том, чтобы придать пептидному антигенному конъюгату форму частицы, как средству для модуляции фармакокинетики и стимулирования поглощения антигенпрезентирующими клетками. Частицы, образованные пептидными антигенными конъюгатами, должны иметь размер от, примерно, 10 нм до 10000 нм в диаметре. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, частицы представляют собой наночастицы, которые имеют размер, который можно привести в эндосомальную систему клеток (таких как, иммунные клетки). Наночастицы могут иметь средний диапазон размеров от, примерно, 10 нм до, примерно, 500 нм в диаметре. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, наночастицы могут иметь средний размер, примерно, 10 нм, примерно, 20 нм, примерно, 30 нм, примерно, 40 нм, примерно, 50 нм, примерно, 100 нм, 200 нм, 300 нм, 400 нм или 500 нм в диаметре. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, наночастицы могут иметь средний размер от, примерно, 10-50 нм, или, примерно, 10-100 нм, или, примерно, 10-200 нм, или, примерно, 10-500 нм в диаметре. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, размер частиц составляет от 20 до 200 нм в диаметре. Частицы в композиции могут различаться по размеру, но, как правило, попадают в диапазоны размеров, указанные в настоящем документе. Например, более 50%, более 55%, более 60%, более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 91%, более 92%, более 93%, более 94%, более 95%, более 96%, более 97%, более 98% или более 99% частиц в композиции будут попадать в пределы диапазонов размеров, указанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) может быть сцеплен с удлинением (B1 или B2), которое сцеплено либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с Частицами (P) или гидрофобными молекулами (H), которые скапливаются в частицы, которые слишком велики для поглощения иммунными клетками (например, частицы, размером более 5000 нм) и образует депо в сайте инъекции.

[00253] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен с предварительно образованной Частицей (P). Частица (P) может состоять из гидрофобных материалов, таких как, полимеры или липиды, поперечно-сшитые гидрофильные полимеры, такие как, гидрогели, или поперечно-сшитые гидрофобные полимеры, такие как, поперечно-сшитый полистирол, которые сохраняют структуру в водных условиях. Неограничивающие примеры Частиц (P) включают полимерные частицы, такие как, поли(молочную-ко-гликолевую кислоту)

(PLGA), полимерсомы или полаксмеры; мицеллы на основе липидов, липосомы или мультиламеллярные везикулы; эмульсии масло-в-воде, такие как, эмульсии минеральное масло-в-воде и вода-в-минеральном масле; и частицы неорганической соли, такие как, частицы соли фосфата алюминия или гидроксида алюминия (то есть, Квасцы). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Частица (P) представляет собой липосомальную наночастицу. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, Частица (P) представляет собой частицу железа. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, Частица (P) представляет собой представляет собой полимерную частицу.

[00254] Эффективность сцепления пептидного антигена (A) с предварительно образованными Частицами (P) зависит от природы пептидного антигена и типа применяемого сцепления. Например, пептидные антигены (A) могут быть адсорбированы или включены в Частицы (P), и эффективность этого процесса может быть определена эмпирически для каждого пептидного антигена (A), так как, природа пептидного антигена (A) может влиять на адсорбцию и включение. Пептидные антигены (A) могут быть сцеплены с Частицей (P) посредством высокоаффинных взаимодействий (например, электростатических) или ковалентной связи, при этом, Частица (P) имеет заданное количество реакционноспособных сайтов, которые будут определять количество пептидных антигенов (A), которые могут быть связаны с Частицей (P). У иммуногенных композиций, содержащих несколько различных пептидных антигенов (A), например, 20 различных пептидных антигенов (A), несколько копий каждого типа пептидного антигена (A) могут доставляться на отдельных Частицах (P), или несколько копий всех 20 типов пептидных антигенов (A) могут доставляться на одной и той же Частице (P).

[00255] Ограничение предварительно образованных Частиц (P) состоит в том, что соотношение антигена к Частице (P) нельзя легко контролировать. В альтернативных, предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) сцеплен либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (H), которая стимулирует скопление частиц в водных условиях. Пептидный антигенный конъюгат, состоящий из пептидного антигена (A), при необходимости, сцепленного посредством удлинения (B1 или B2), который сцеплен либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (H), представляет собой объект, определяемый на молекулярном уровне, и соотношение пептидных антигенов (A) к гидрофобной молекуле (H) можно точно контролировать. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, соотношение пептидного антигена (A) к гидрофобной молекуле (H) составляет 1:1. В дополнительных

неограничивающих примерах, соотношение пептидных антигенов (А) к гидрофобным молекулам (Н) может составлять от 1:3 до 3:1.

[00256] В отличие от предварительно образованных частиц, пептидный антигенный конъюгат может быть образован путем сцепления пептидного антигена (А), непосредственно или опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2) и/или Линкера (L), с гидрофобным блоком (Н), продуцирующим получение одиночной химически определяемой молекулы. Гидрофобная молекула (Н) представляет собой молекулу, имеющую по существу ограниченную растворимость в воде или обладающую амфифильными свойствами и способную скапливаться в надмолекулярные структуры, например, мицеллярные, нано- или микрочастицы в водных условиях. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) является нерастворимой или образует мицеллы в водных условиях до концентрации, примерно, 0,1 мг/мл или до концентрации, примерно, 0,01 мг/мл.

[00257] Гидрофобная молекула (Н) может быть выбрана из любых молекул, содержащих высшие алканы, циклические ароматические соединения, жирные кислоты, соединения, получаемые из терпенов/изопренов или полимеров, которые имеют ограниченную растворимость в воде и/или амфифильные характеристики, что приводит к скоплению молекул в частицы в водных условиях. Типичные высшие алканы включают, но этим не ограничиваются, октан, нонан, декан, ундекан, додекан, тридекан, тетрадекан, пентадекан, гексадекан, гептадекан и октадекан. Типичные циклические ароматические соединения включают, но этим не ограничиваются, бензольные и конденсированные бензольные кольцевые структуры или молекулы гетероциклических ароматических соединений. Типичные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты включают, но этим не ограничиваются, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту или олеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой жирную кислоту, например, миристиновую кислоту. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) содержит диациллипид, такой как, 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин или 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин или липопептид, например, Pam2Cys. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) на основе жирных кислот или липидов может дополнительно содержать PEG. Типичные соединения, полученные из терпенов/изопрена, включают производные стерола, такие как, холестерин и сквален. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) содержит холестерин.

[00258] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер с ограниченной растворимостью в воде или является амфифильной и способна скапливаться в частицы, например, мицеллы в водных условиях. Типичные полимеры включают, но этим не ограничиваются, PLGA, гидрофобные поли(аминокислоты), поли(бензилглутамат), полистирол, полаксмеры на основе мономеров этиленоксида, пропиленоксида и чувствительные к температуре полимеры, такие как, поли(N,N'-диэтилакриламид), поли(N-п-пропилакриламид), Поли(N-изопропилакриламид), поли[ди(этиленгликоль)метакрилат метиловый эфир] и определенные пегилированные поли(аминокислоты), такие как, Поли(γ -(2-метоксиэтокси)эстерил-L-глутамат). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой поли(аминокислоту), состоящую из гидрофобных аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н), содержащая поли(аминокислоту), состоит из аминокислот, которые содержат ароматические кольца. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой поли(аминокислоту), которая сцеплена с Лигандами, такими как агонисты PRR. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой диблок-сополимер типа А-В. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, диблок-сополимер является чувствительным к температуре и способным скапливаться в частицы в ответ на температурный сдвиг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н), содержащая диблок-сополимер типа А-В, дополнительно содержит Лиганды, такие как, агонист PRR, сцепленный с одним блоком диблок-сополимера. Полимеры, применяемые в качестве гидрофобных молекул (Н) для пептидных антигенных конъюгатов, более подробно описаны ниже.

Полимеры

[00259] Гидрофобная молекула (Н) или Частица (Р) может содержать линейный или разветвленный полимер. Полимер может представлять собой гомополимер, сополимер или терполимер. Полимер может состоять из, по меньшей мере, одного мономерного звена другого типа. Полимер может представлять собой статистический сополимер или чередующийся сополимер. Полимер может представлять собой блок-сополимер, такой как, тип А-В, или полимер может состоять из привитого сополимера, в результате чего, два полимера сцеплены посредством реакции, аналогичной полимерной.

[00260] Гидрофобная молекула (Н) или Частица (Р) могут содержать полимеры, содержащие мономеры природного и/или не природного происхождения и их комбинации.

Природные биополимеры могут включать пептиды, состоящие из аминокислот (иногда именуемых поли(аминокислотами)); конкретный пример – поли(триптофан). Природный биополимер может быть химически модифицирован. Например, биополимеры, состоящие из остатков глутаминовой кислоты или лизина, могут быть модифицированы в соответствии с гамма-карбоксильной или эпсилон-аминной группой, соответственно, для присоединения Лиганда. Биополимеры могут представлять собой полисахариды, которые могут включать, но этим не ограничиваются, гликоген, целлюлозу и декстран. Дополнительные примеры включают полисахариды, которые встречаются в природе, в том числе, альгинат и хитозан. Полимеры также могут состоять из малых молекул природного происхождения, таких как, молочная кислота или гликолевая кислота, или могут представлять собой сополимер этих двух компонентов (то есть, PLGA).

[00261] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) или частица (Р) состоит из анионного (например, поли(кислотного)) полимера или катионного (например, поли(основного)) полимера, или из комбинаций анионных и катионных полимеров. Катионные полимеры могут связываться с отрицательно заряженными пептидами посредством электростатического взаимодействия или могут подходить для комплексообразования с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами, такими как, ДНК и РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер представляет собой нерастворимый в воде цвиттер-ион при рН 7,4, но он несет суммарный положительный заряд при рН менее, примерно, 6 и является растворимым в воде. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н), содержащая первый полимер, несет положительный или отрицательный заряд, который комплементарен отрицательному или положительному заряду, соответственно, на втором полимере, и, первый и второй полимеры образуют электростатический комплекс, посредством нейтрализации заряда, что делает комплекс нерастворимым. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, катионный полимер может представлять собой поли(амин) природного происхождения или синтетический, такой как, поли(лизин) или поли(этиленимин) (PEI). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, катионный полимер может представлять собой поли(амидоамин) (РАА) или поли(бета-аминоэфир) (РВАЕ), продуцированный в результате реакции присоединения Михаэля аминов либо к бис(акриламидам), либо к бис(акриловыми эфирам). Неограничивающие примеры катионных полимеров, которые можно применять в раскрытых вариантах осуществления настоящего изобретения, включают поли(этиленимин), поли(аллиланион гидрохлорид; РАН), путресцин, кадаверин, поли(лизин) (PL), поли(аргинин), поли(триметиленимин),

поли(тетраметиленимин), поли(пропиленимин), аминогликозид-полиамин, дидезокси-диамино-*b*-циклодекстрин, спермин, спермидин, кадаверин, поли(2-диметиламино)этилметакрилат, поли(гистидин), катионированный желатин, дендримеры, хитозан и любую их комбинацию. Катионный полимер может содержать четвертичную аммониевую группу, такую как группа, присутствующая на метилированном хитозане. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, полимер может представлять собой анионный полимер. В некоторых неограничивающих примерах, полианионный полимер представляет собой поли(глутаминовую кислоту). В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения, полианионный полимер представляет собой поли(аспарагиновую кислоту). Полимер может представлять собой полимер на основе полифосфоэфира. Полимер может содержать природные анионные полисахариды, включая, например, альгиновую кислоту, состоящую из 1-4)-сцепленного β -D-маннуроната и гулуруновой кислоты. Полимер может содержать нуклеотиды. Другие полианионные полимеры также могут быть подходящими.

[00262] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой растворимый в воде катионный полимер в определенных диапазонах pH, но он не заряжен и нерастворим в воде при диапазонах pH, близких к физиологической норме pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер, который содержит ароматические амины, при этом, pKa сопряженной с основанием кислоты ароматического амина составляет менее 7,5. При значении pH ниже pKa ароматических аминов, ароматический амин протонируется и, следовательно, наделяет полимер положительным зарядом. Неограничивающим примером гидрофобной молекулы (H), состоящей из полимера, содержащего ароматические амины, является поли(фенилаланин амин). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер, который содержит азотистые гетероциклы, при этом, pKa атома азота, содержащего гетероцикл, составляет менее 7,5. При значении pH ниже pKa атома азота, содержащего гетероцикл, азот протонируется и наделяет полимер положительным зарядом. Неограничивающим примером гидрофобной молекулы (H), состоящей из полимера, содержащего гетероцикл с протонируемыми (то есть, основными) атомами азота, является поли(гистидин). В настоящем документе, мы сообщаем о неожиданном открытии того факта, что гидрофобные молекулы, состоящие из полимеров, которые содержат протонируемый азот (например, ароматический амин), предлагают неожиданные улучшения в изготовлении, стабильности частиц и биологической активности.

[00263] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) может представлять собой полимер на основе поли(диэтиленгликоль метиловый эфир метакрилат)-(DEGMA). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер, который может включать мономеры (мет)акрилатов, (мет)акриламидов, фрагменты стирила и винила. Конкретные примеры (мет)акрилатов, (мет)акриламидов, а также мономеров на основе стирила и винила включают N-2-гидроксипропил(метакриламид) (HPMA), гидроксиэтил(метакрилат) (HEMA), стирол и винилпирролидон (PVP) соответственно. Полимер может быть термореактивным полимером, состоящим из мономеров N-изопропилакриламида (NIPAAm); N-изопропилметакриламида (NIPMAm); N,N'-диэтилакриламида (DEAAm); N-(L)-(1-гидроксиметил)пропил метакриламида (HMPMAm); N,N'-диметилэтилметакрилата (DMEMA), 2-(2-метоксиэтокси)этил метакрилата (DEGMA). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобный полимер представляет собой полимер, содержащий мономеры HPMA или HPMA DEGMA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер, содержащий мономеры HPMA и DEGMA, представляет собой диблок-полимер типа А-В. Неожиданное открытие, о котором сообщается в настоящем документе, заключается в том, что пептидные антигены (А), сцепленные с диблок-сополимерами типа А-В, содержащими гидрофильный блок HPMA, скапливаются в мицеллы наночастиц одинакового размера, независимо от композиции пептидного антигена (А).

[00264] Гидрофобная молекула (H) может также содержать полимеры на основе циклических мономеров, которые включают циклические уретаны, циклические простые эфиры, циклические амиды, циклические сложные эфиры, циклические ангидриды, циклические сульфиды и циклические амины.

[00265] Гидрофобные молекулы (H) на основе полимеров, содержащих циклические мономеры, могут быть продуцированы полимеризацией с раскрытием кольца и включают сложные полиэфиры, простые полиэфиры, полиамины, поликарбонаты, полиамиды, полиуретаны и полифосфаты; конкретные примеры могут включать, но этим не ограничиваются, поликапролактон и поли(этиленимин) (PEI). Подходящие полимеры также могут быть продуцированы посредством реакций конденсации и включают полиамиды, полиацетали и сложные полиэфиры.

[00266] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер, который может включать от 3 до 10000 мономерных звеньев. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего

изобретения, полимер включает от, примерно, 3 до 300 мономерных звеньев, например, от 3 до 10, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 мономерных звеньев; или от, примерно, 10 до 100 мономерных звеньев, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100; или от, примерно, 100 до 200 мономерных звеньев; или от, примерно, 200 до 300 мономерных звеньев, обычно не более 1000 мономерных звеньев. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер может содержать вплоть до 1000-10000 мономерных звеньев. Как правило, по меньшей мере, пять мономеров необходимы для образования размера гидрофобной молекулы (Н), достаточного, чтобы стимулировать образование частиц пептидного антигенного конъюгата, однако неожиданно оказалось, что гидрофобных молекул (Н), состоящих из полимеров лишь с 3 мономерами, которые включают ароматические кольца, было достаточно, чтобы управлять скоплением частиц пептидных антигенных конъюгатов. Увеличение длины полимера с 3 до 5 и с 5 до 10 мономеров увеличивает мощь сил, стимулирующих образование частиц, что приводит к более стабильным и имеющим больший размер частицам, образованным пептидными антигенными конъюгатами. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н), содержащая пептидный антигенный конъюгат, представляет собой полимер, состоящий из 5-100 мономеров, что приводит к образованию частиц диаметром приблизительно 10-300 нм в водных условиях. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер, содержащий гидрофобную молекулу (Н), состоит из, примерно, 300 мономеров и приводит к пептидным антигенным конъюгатам, которые скапливаются в частицы размером от, примерно, 20 до 500 нм или, примерно, 100-500 нм.

[00267] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, средняя молекулярная масса полимера, содержащего гидрофобную молекулу (Н), может составлять от, примерно, 1000 до 1000000 г/моль. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, средняя молекулярная масса полимера составляет от, примерно, 1000 до 60000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, молекулярная масса полимера составляет от, примерно, 1000 до 5000 или от, примерно, 5000 до 10000, или от, примерно, 10000 до 20000, или от, примерно, 20000 до 30000, или от, примерно, 25000 до 60000. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой диблок-полимер типа А-В со средней молекулярной массой от, примерно, 10000 г/моль до, примерно, 60000 г/моль, такой как, примерно, 10000 г/моль, 20000 г/моль, 30000 г/моль, 40000 г/моль, 50000 г/моль или 60000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер представляет собой диблок-полимер

типа А-В, при этом, соотношение молекулярных масс блока А и блоков В составляет от, примерно, 1:5 до, примерно, 5: 1. В неограничивающих примерах, диблок-полимер типа А-В со средней молекулярной массой, примерно, 60000 г/моль состоит из блока А со средней молекулярной массой, примерно, 10000 г/моль и блока В со средней молекулярной массой, примерно, 50000 г/моль; блок А со средней молекулярной массой, примерно, 20000 г/моль и блок В со средней молекулярной массой, примерно, 40000 г/моль; блок А со средней молекулярной массой, примерно, 30000 г/моль и блок В со средней молекулярной массой, примерно, 30000 г/моль; блок А со средней молекулярной массой, примерно, 40000 г/моль и блок В со средней молекулярной массой, примерно, 20000 г/моль; блок А со средней молекулярной массой, примерно, 50000 г/моль и блок В со средней молекулярной массой, примерно, 10000 г/моль.

[00268] Полидисперсность, M_w/M_n , полимера может составлять от, примерно, 1,0 до, примерно, 5,0. Полимеры могут быть образованы различными методами полимеризации. Полимеры на основе пептидов и нуклеотидов могут быть получены твердофазным синтезом и будут иметь полидисперсность 1,0, поскольку полимеры являются определяемыми на молекулярном уровне. Полимеры, образованные в результате полимеризации с ростом цепи, будут иметь полидисперсность $> 1,0$. Полимеры могут быть синтезированы методами живой полимеризации или радиальной полимеризации без раствора. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, биополимеры на основе пептидов синтезируют посредством твердофазного пептидного синтеза. Полимеры на основе пептидов (или «поли(аминокислоты)»), содержащие аминокислоты с ароматическими кольцами, такие как, триптофан, хотя и являются гидрофобными в водных условиях, обеспечивают неожиданные улучшения в изготовлении посредством твердофазного синтеза, по сравнению с пептидами (или «поли(аминокислотами)») без ароматических колец. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные молекулы (Н) на основе пептидов, продуцированных посредством твердофазного синтеза, включают аминокислоты, содержащие ароматические кольца. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, полимеры на основе акриламида и акрилата синтезируют полимеризацией путём обратимого присоединения и фрагментирования (RAFT). В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, поли(аминокислоты) и поли(фосфоэфир) синтезируют полимеризацией с раскрытием кольца.

[00269] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) может содержать полимер, который дополнительно содержит

Лиганд или Лиганды, такие как, агонисты PRR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные молекулы (H) на основе полимеров могут включать мономеры, которые содержат, по меньшей мере, одну функциональную группу, которая может быть связана с Лигандом или с линкером, который может быть связан с Лигандом. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) на основе полимера может содержать Лиганды, которые сцеплены с концами и/или боковыми цепями полимера.

[00270] В предпочтительных вариантах осуществления иммуногенных композиций по настоящему изобретению, в целях лечения или профилактики рака и инфекционных заболеваний, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер, который сцеплен с Лигандами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) на основе полимера, содержит структуру ароматического кольца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, сцепленный с полимером, является гидрофобным и стимулирует повышенную стабильность частиц, образованных пептидным антигенным конъюгатом в водных условиях. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) на основе полимера, содержит гетероциклическое ароматическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, лиганд, который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) на основе полимера, содержит ароматическое кольцо, дополнительно содержащее ариламин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, лиганд, присоединенный к гидрофобной молекуле (H), представляет собой гидрофобный лиганд, содержащий гетероциклическое ароматическое кольцо, при необходимости, при этом, гидрофобный Лиганд дополнительно содержит ароматический амин (то есть, Ar-NH₂). В вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, гидрофобная молекула (H) содержит Лиганд, который содержит ароматическую группу, при необходимости, содержащую гетероцикл и/или ариламин, мы сообщаем о неожиданном открытии того факта, что такая гидрофобная молекула (H) хорошо растворима в фармацевтически приемлемых органических растворителях, таких как, DMSO и этанол, но нерастворима в водных буферных растворах.

[00271] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, сцепленный с гидрофобной молекулой (H) на основе полимера, представляет собой агонист паттерн-распознающего рецептора (PRRa), такой как, агонист STING, рецепторов NOD или TLR, который обладает адъювантными свойствами. Лиганд с адъювантными свойствами, сцепленный с полимером, может представлять собой или быть получен из

любого подходящего адъювантного соединения, такого как, агонист PRR. Подходящие Лиганды с адъювантными свойствами включают соединения, которые включают малые органические молекулы, то есть, молекулы, имеющие молекулярную массу менее, примерно, 3000 дальтон, хотя, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, адъювант может иметь молекулярную массу менее, примерно, 700 дальтон, а в некоторых случаях, адъювант может иметь молекулярную массу от, примерно, 200 дальтон до, примерно, 700 дальтон.

[00272] Гидрофобная молекула (Н), в предпочтительных вариантах осуществления иммуногенных композиций по настоящему изобретению, применяемая для лечения или профилактики рака и инфекционных заболеваний, представляет собой полимер, сцепленный с Лигандами, имеющими адъювантные свойства. Лиганды с адъювантными свойствами, такие как, агонисты PRR, могут быть сцеплены с боковыми цепями или концевыми группами полимера посредством любого подходящего линкера. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мономеры, содержащие гидрофобную молекулу (Н) на основе полимера, содержат боковую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну функциональную группу, которая может быть связана с Лигандом с адъювантными свойствами, или с линкером, который может быть связан с Лигандом с адъювантными свойствами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, гидрофобная молекула (Н) на основе полимера содержит Лиганд с адъювантными свойствами, все мономеры полимера сцеплены с Лигандом с адъювантными свойствами. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, гидрофобная молекула (Н) содержит Лиганд с адъювантными свойствами, не все мономеры в полимере сцеплены с адъювантом.

[00273] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, гидрофобная молекула (Н) содержит полимер, сцепленный с Лигандом с адъювантными свойствами через мономерные звенья, распределенные вдоль остова полимера, увеличение плотности Лиганда на полимере приводит к неожиданному улучшению иммунных ответов на пептидный антиген (Н).

[00274] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, мольное соотношение Лигандов с адъювантными свойствами, таких как, агонисты PRR, к мономерам полимера может быть выбрано из следующего: от, примерно, 1: 100 до 1: 1 моль/моль (или от, примерно, 1 моль % до, примерно, 100 моль %), например, от 1: 2,5 до 1: 1 моль/моль.

[00275] Плотность Лиганда с адъювантными свойствами, такого как, агонисты PRR, сцепленного с полимером, может варьироваться по мере необходимости для

конкретных применений. Лиганд с адьювантными свойствами, такой как, агонисты PRR, может быть сцеплен с полимером от 1 до 100 моль %, например, от 1 до 10 моль % или от 50-100 моль %. Моль % относится к проценту мономеров, содержащих полимер, которые сцеплены с Лигандом с адьювантными свойствами, такими как, агонисты PRR. Например, 10 моль % Лиганда (например, агонистов PRR) равно 10 мономерным звеньям, сцепленным с Лигандом, из общего количества 100 мономерных звеньев. Остальные 90 могут представлять собой мономерные звенья, образующие макромолекулы, которые не сцеплены с Лигандом.

[00276] Плотность Лигандов, таких как, Лиганды с адьювантными свойствами, сцепленные с гидрофобной молекулой (H) на основе полимера, следует выбирать для обеспечения того обстоятельства, чтобы пептидный антигенный конъюгат (i) был растворим в фармацевтически приемлемых органических растворителях, таких как DMSO; (ii) мог образовывать стабильные наночастицы в водных условиях при температуре и pH физиологической нормы; и/или (iii) был способен индуцировать иммунный ответ, в частности, Т-клеточный ответ, у субъекта.

[00277] Оптимальная плотность Лигандов, таких как агонисты PRR, сцепленных с полимером, зависит от полимерной композиции, длины полимера, а также от состава Лиганда. Когда Лиганд представляет собой гидрофобную/амфифильную молекулу с низкой растворимостью в воде, такую как, агонист Толл-подобных рецепторов-7 и -8 (TLR-7/8a) на основе имидазохинолина, и один полимер является растворимым в воде (то есть, полимер, не сцепленный с Лигандом, является растворимым в воде), Лиганд, как правило, сцеплен с полимером при плотности, примерно, 20-100 моль %, когда полимер состоит из, примерно, 5-30 мономерных звеньев; 10-50 моль %, когда полимер состоит из 30-100 мономерных звеньев; или при плотности 5-20 моль %, когда полимер состоит из 100-300 мономерных звеньев. Как правило, моль % Лиганда с адьювантными свойствами выше для более коротких полимеров и ниже для более длинных полимеров.

[00278] Оптимальная плотность Лиганда с адьювантными свойствами, например, PRRa, присоединенного к гидрофильным или чувствительным к температуре полимерам, которые превышают 10000 г/моль и основаны на сомономерам, выбранных из N-2-гидроксипропил(метакриламида) (HPMA), гидроксиэтил(метакрилата) (HEMA), стирола, винилпирролидона (PVP), N-изопропилакриламида (NIPAAm); N-изопропилметакриламида (NIPMAm); N,N'-диэтилакриламида (DEAAm); N-(L)-(1-гидроксиметил)пропил метакриламида (HMPMAm); N,N'-диметилэтилметакрилата (DMEMA), 2-(2-метоксиэтокси)этил метакрилата (DEGMA) или замещенных поли(фосфоэфиров) составляет от 1 до 25%, например, плотность адьюванта,

присоединенного к полимеру, может составлять, примерно, 1 %, примерно, 2%, примерно, 3%, примерно, 4%, примерно, 5%, примерно, 6%, примерно, 7%, примерно, 8%, примерно, 9%, примерно, 10%, примерно, 11%, примерно, 12%, примерно, 13%, примерно, 14%, примерно, 15%, примерно, 16%, примерно, 17%, примерно, 18%, примерно, 19%, примерно, 20%, примерно, 21%, примерно, 22%, примерно, 23%, примерно, 24% или, примерно, 25%.

[00279] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой амфифильный диблок-сополимер типа А-В, при этом, один блок является гидрофобным, а другой блок гидрофильным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, где гидрофобная молекула (Н) представляет собой амфифильный диблок-сополимер типа А-В, а Лиганд является гидрофобным, таким как, агонист имидазохинолина TLR-7/8, Лиганд, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, сцеплен с гидрофобным блоком при плотности от, примерно, 1 до 50 моль %, обычно от, примерно, 1 до 20 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, где гидрофобная молекула (Н) представляет собой амфифильный диблок-сополимер типа А-В, а Лиганд является гидрофильным, Лиганд, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, сцеплен с гидрофильным блоком при плотности от, примерно, 1 до 20 моль %, или на гидрофильном конце гидрофильного блока и, следовательно, диблок-сополимер типа А-В является полутелехелатным по отношению к Лиганду. В неограничивающем примере, гидрофобная молекула (Н) содержит чувствительный к температуре диблок-сополимер типа А-В, содержащий блок HPMA и блок DEGMA, а агонист имидазохинолина TLR-7/8 сцеплен с блоком DEGMA при плотности от, примерно, 1 до 5 моль %. В дополнительном неограничивающем примере, гидрофобная молекула (Н) содержит диблок-полимер типа А-В, содержащий гидрофобный блок сополимера HPMA и гидрофильный блок гомополимера HPMA, а агонист имидазохинолина TLR-7/8 сцеплен с гидрофобным блоком сополимера HPMA при плотности, примерно, 20 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула представляет собой триблок-сополимер, например, композиции А-В-А или другие мультиблок-сополимеры.

[00280] Неожиданное открытие, о котором сообщается в настоящем документе, заключается в том, что пептидные антигены (А), сцепленные с диблок-сополимерами типа А-В, содержащими гидрофильный блок HPMA, сцепленный с Лигандами с адьювантными свойствами, скапливаются в мицеллы из наночастиц одинакового размера, независимого от композиции пептидного антигена (А), и эта повышенная надежность образования

мицелл из наночастиц была ассоциирована с повышенной интенсивностью Т-клеточного иммунитета. В неограничивающем примере, пептидный антиген (А) сцеплен с диблок-сополимером, состоящим из гидрофобного блока сополимера HPMA (то есть, $p[(HPMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}Ala\text{-}2B)]$) и гидрофильного блока гомополимера HPMA (то есть, $p(HPMA)$), посредством триазольного линкера (Lys(N3)-DBCO), с образованием пептидного антигенного конъюгата $p\{[(HPMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}Ala\text{-}2B)]\text{-}b\text{-}p(HPMA)\}\text{-}DBCO\text{-}(Lys(N3))\text{-}A$, при этом, 2В представляет собой TLR-7/8a, также именуемый **Соединением 1**. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен с диблок-сополимером, состоящим из гидрофобного блока сополимера DEGMA (то есть, $p[(DEGMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}Ala\text{-}2B)]$) и гидрофильного блока гомополимера HPMA (то есть, $p(HPMA)$), посредством триазольного линкера (Lys(N3)-DBCO), с образованием пептидного антигенного конъюгата $p\{[(DEGMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}Ala\text{-}2B)]\text{-}b\text{-}p(HPMA)\}\text{-}DBCO\text{-}(Lys(N3))\text{-}A$, при этом, 2В представляет собой TLR-7/8a, также именуемый **Соединением 1**. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) сцеплен с диблок-сополимером, состоящим из гомополимера DEGMA, сцепленного с лигандом с адьювантными свойствами (то есть, 2ВХу- $p[(DEGMA)]$) и гидрофильным блоком гомополимера HPMA (то есть, $p(HPMA)$), посредством триазольного линкера (Lys(N3)-DBCO), с образованием пептидного антигенного конъюгата $2ВХу\text{-}p\{[(DEGMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}Ala\text{-}2B)]\text{-}b\text{-}p(HPMA)\}\text{-}DBCO\text{-}(Lys(N3))\text{-}A$, при этом, пептидный антиген (А) и 2ВХу (TLR-7/8a, также именуемый **Соединением 2**), сцеплены в одном сайте на противоположных концах полимера, что делает полимер гетеротелехелатным.

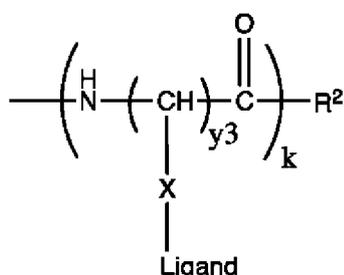
[00281] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), который состоит из сомономеров глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, и ароматических и/или гидрофобных аминокислот, таких как, фенилаланин, аминокислоты фенилаланинамин (или «фенилаланинамин»), триптофан, тирозин, бензил глутамат, гистидин, лейцин, изолейцин, норлейцин и валин, и, по меньшей мере, один Лиганд с адьювантными свойствами, например, PRRa, присоединен к полимеру посредством гамма-карбоновой кислоты глутаминовой кислоты или бета-карбоновой кислоты аспарагиновой кислоты. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), состоящий из сомономеров глутаминовой кислоты и триптофана, при этом, по меньшей мере, один Лиганд с адьювантными свойствами, например, PRRa, сцеплен с остатками глутаминовой кислотой посредством гамма-карбоновой кислоты. В

дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), состоящего из сомономеров лизина и ароматических, и/или гидрофобных аминокислот, таких как, фенилаланин, амино фенилаланин, гистидин, триптофан, тирозин, бензил глутамат, лейцин, изолейцин, норлейцин и валин, при этом, по меньшей мере, один Лиганд с адьювантными свойствами, например, PRRa, присоединен к полимеру посредством эpsilon-амин лизина. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), состоящий из сомономеров лизина и триптофана, при этом, по меньшей мере, один Лиганд с адьювантными свойствами, например, PRRa, сцеплен с лизином посредством эpsilon-амин лизина. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, гидрофобная молекула (Н) представляет собой сополимер на основе поли(аминокислоты), сцепленный с, по меньшей мере, одним Лигандом с адьювантными свойствами, например, с PRRa, полимер имеет длину 5-30 аминокислот, а адьювант присоединен при плотности от 20 до 100 моль %, такой как, 30%, 50%, 60%, 80% и 100 моль %. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд присоединен только к одному концу полимера поли(аминокислоты), то есть, к полутелухелатному полимеру. В настоящем документе, мы сообщаем о неожиданном открытии того факта, что гидрофобные молекулы (Н), состоящие из сополимеров на основе поли(аминокислоты), которые дополнительно содержат ароматические группы, такие как, ароматические аминокислоты (например, фенилаланин, амино фенилаланин, гистидин, триптофан, тирозин, бензил глутамат), или ароматических Лигандов (например, имидазохинолинов), сцепленных с полимером, приводят к неожиданным улучшениям технологичности изготовления, благодаря улучшенной растворимости в органическом растворителе, и к улучшенной стабильности частиц, и биологической активности пептидных антигенных конъюгатов, по сравнению с поли(аминокислотами), преимущественно состоящими из алифатических аминокислот или алифатических Лигандов. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные молекулы (Н), состоящие из поли(аминокислот) или других классов полимеров, включают, по меньшей мере, одну ароматическую аминокислоту и/или Лиганд, который содержит ароматическую группу.

[00282] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), состоящий полностью из глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты или остатков неприродных аминокислот, несущих карбоновую кислоту, при этом, Лиганд со

адьювантными свойствами сцеплен со всеми из следующего: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или остатки неприродной аминокислоты, то есть, Лиганд с адьювантными свойствами присоединен при плотности 100 моль %. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), состоящий полностью из Лизина или неприродных аминокислот, несущих свободный амин, и Лиганд с адьювантными свойствами сцеплен со всем из следующего: лизин или остатки природной аминокислоты, то есть, адьювант присоединен при плотности 100 моль %. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пегилированные сомомеры, такие как, γ -(2-метоксиэтокс)эстерил-L-глутамат), включены для наделения сополимера свойствами чувствительности к температуре. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, чувствительные к температуре полимеры могут быть привиты к подвешенным боковым цепям поли(аминокислоты) с образованием привитого сополимера. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, чувствительный к температуре полимер может быть сцеплен с концом поли(аминокислотных) полимеров с образованием чувствительного к температуре диблок-полимера. В других дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, второй полимер, который является гидрофобным, может быть сцеплен с поли(аминокислотным) полимером, который сцеплен с Лигандами с адьювантными свойствами, либо посредством подвешенных боковых групп с образованием привитого сополимера, либо с концом поли(аминокислоты) с образованием диблок-сополимера.

[00283] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), сцепленный с Лигандом, таким как, гидрофобный Лиганд с адьювантными свойствами, и имеет формулу:

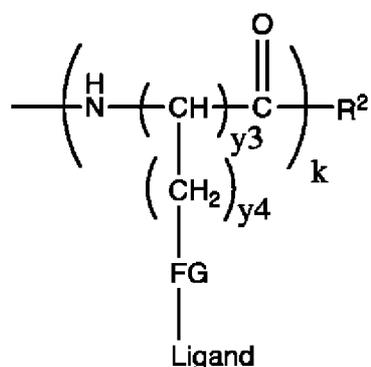


Формула I

[00284] В Формуле I, R² обычно выбирают из одного из следующих: водород, гидроксил или амин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R² сцеплен с Лигандом или другим полимером посредством любой подходящей линкерной

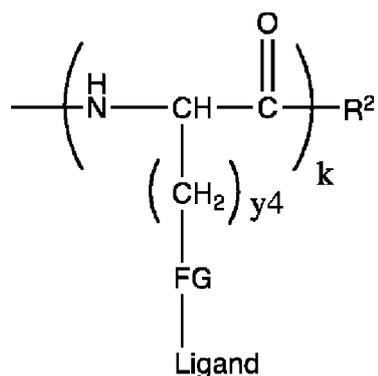
молекулы. Количество метиленовых звеньев, y_3 , обычно составляет от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. N-концевой амин поли(аминокислоты) Формулы I обычно сцеплен с предшественником линкера X2 или может быть сцеплен с пептидным антигеном (A) либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2). Количество повторов мономеров обозначено как k и обычно составляет от 3 до 300. Любой подходящий линкер, X, применяется для сцепления Лиганда, такого как, гидрофобный Лиганд с адьювантными свойствами, с остовом поли(аминокислоты). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер X может быть сцеплен со вторым полимером, который сцеплен с Лигандами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мономеры k могут быть сцеплены с, по меньшей мере, двумя различными лигандами.

[00285] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимеры на основе поли(аминокислоты) Формулы I представляют собой:



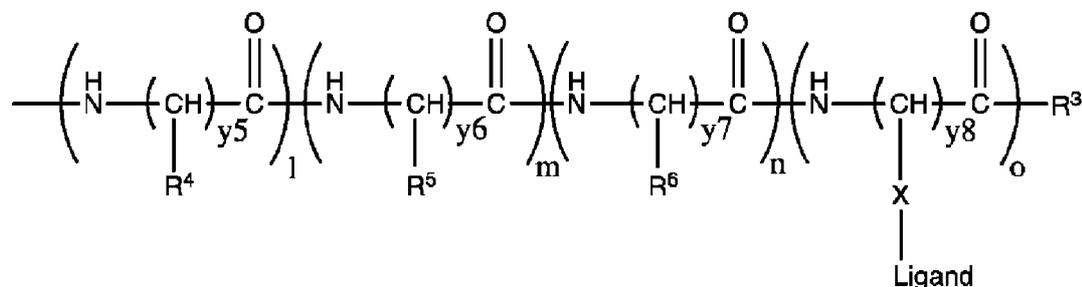
при этом, y_4 представляет собой любое целое число, такое как, 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Лиганд может быть сцеплен с функциональными группами (FG) любыми подходящими средствами, и FG представляет собой любую подходящую функциональную группу, включая амин, карбоновую кислоту, тиол, гидроксил, азид, алкин, гидразин, альдегид или кетон, для присоединения, то есть, сцепления, Лиганда, либо непосредственно, либо посредством линкера.

[00286] Когда y_3 равен 1, полимеры на основе поли(аминокислоты) Формулы I представляют собой:



[00287] N-конец поли(аминокислоты) Формулы I может быть сцеплен посредством Линкера (L) с пептидным антигеном (A) посредством любых подходящих средств. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы I сцеплен непосредственно с C-концом пептидного антигена (A) или с C-концом удлинения B2 посредством амидной связи. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы I сцеплен с предшественником линкера (X2), который вступает в реакцию с предшественником линкера (X1), который сцеплен, непосредственно или посредством удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера (X2), содержащий циклооктин (например, DBCO), присоединен к N-концу поли(аминокислоты) Формулы I и вступает в реакцию с азидсодержащим предшественником линкера (X1) с образованием триазольной связи.

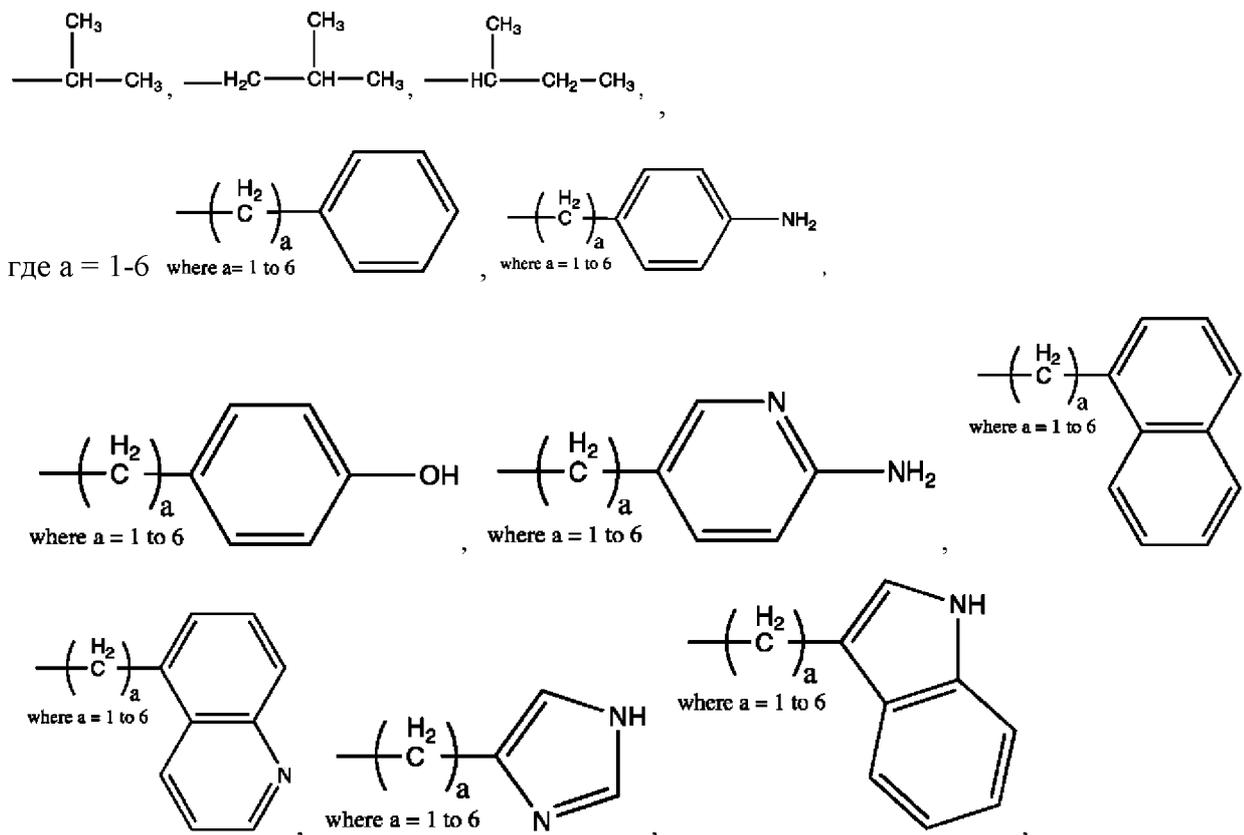
[00288] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) на основе поли(аминокислоты) может содержать гидрофобные аминокислоты (например, ароматические аминокислоты) или гидрофобные аминокислоты (например, ароматические аминокислоты) и аминокислоты, сцепленные с Лигандами, а также дополнительные аминокислоты, такие как, заряженные или гидрофильные аминокислоты, которые подходят для компенсации или модуляции физических и химических характеристик гидрофобной молекулы (H) для продуцирования материала, который, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, является растворимым в органических растворителях в процессе изготовления, но способен образовывать частицы в водных условиях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (H) представляет собой полимер на основе поли(аминокислоты), который имеет формулу:

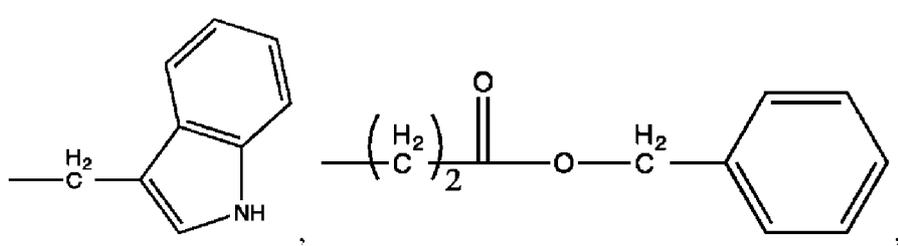
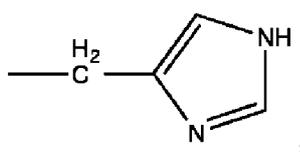
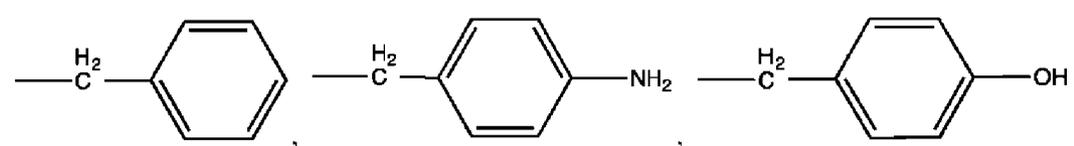
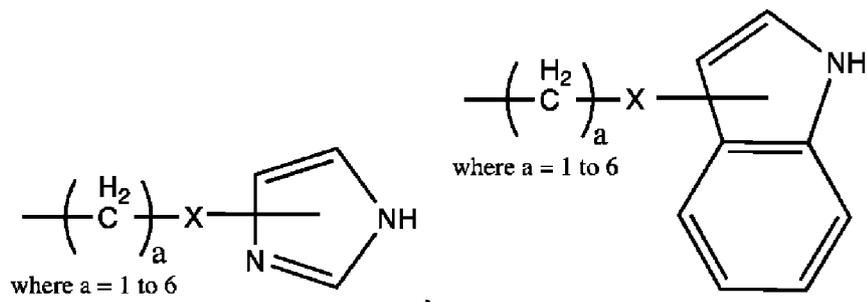
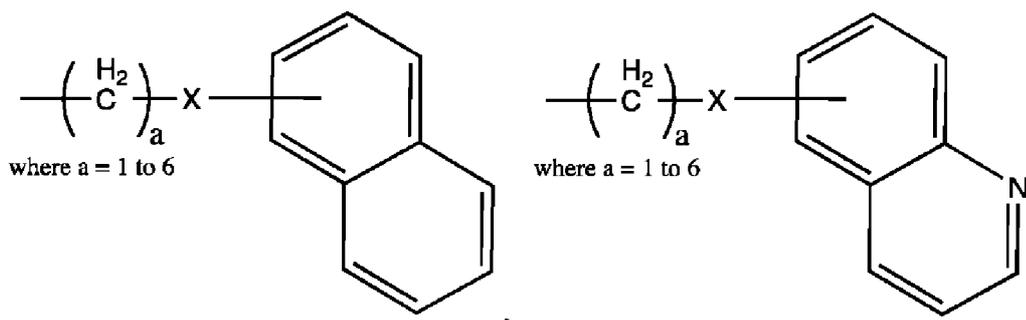
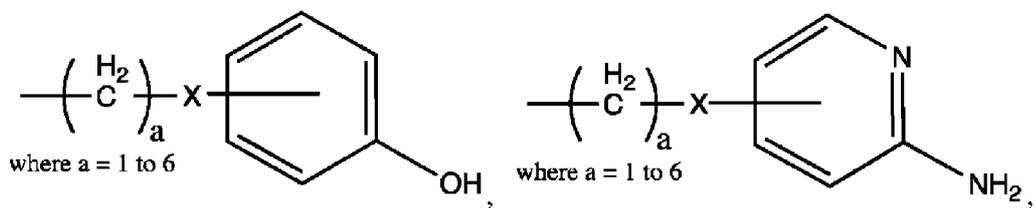
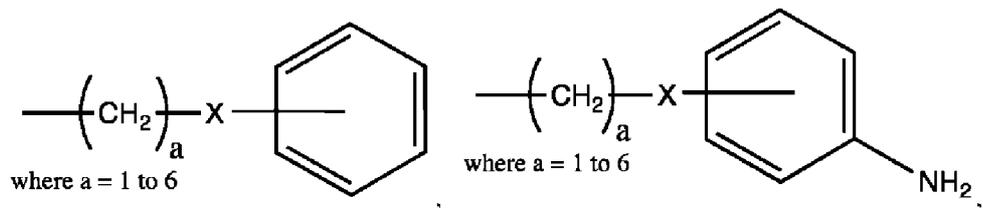


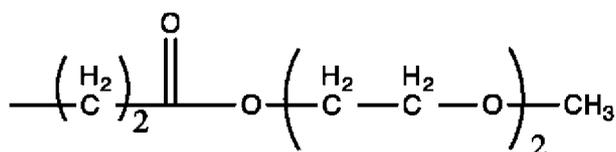
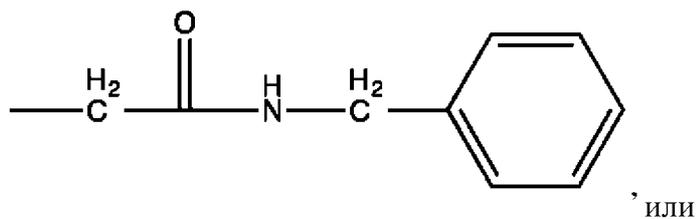
Формула II

[00289] Полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II обычно содержит мономер, 1, и дополнительные мономеры m, n и o. R³ обычно выбирают из одного из следующих: водород, гидроксил или амин. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения, R^3 представляет собой Лиганд, такой как, Лиганд с адьювантными свойствами, или другой полимер, который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) посредством любой подходящей линкерной молекулы. Количество метиленовых звеньев, обозначаемых как y_5 , y_6 , y_7 и y_8 , обычно составляет от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. N-концевой амин поли(аминокислоты) Формулы I обычно сцеплен с предшественником линкера X2 или может быть сцеплен с пептидным антигеном (A) либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2). В типичных вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит мономеры, 1, которые выбраны из любой природной или не природной аминокислоты, при этом, R^4 выбран из низших алкильных или ароматических групп, и наделяют остов полимера гидрофобными свойствами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R^4 , включенный в Формулу II, может быть выбран из



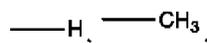




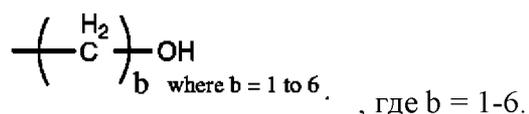
, при этом, X из R⁴ представляет

собой любой подходящий линкер.

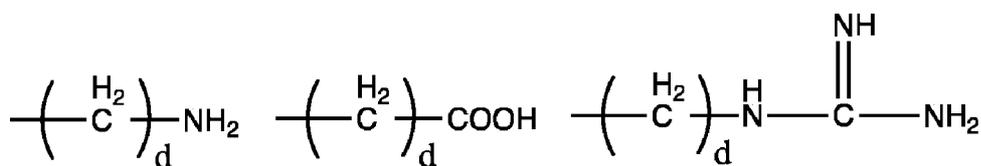
[00290] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит дополнительные сомомеры, m, которые выбраны из любой природной или неприродной аминокислоты, такой как, спейсер PEG аминокислоты (например, m из Формулы II представляет собой -NH-(CH₂-CH₂-O)_{y9}-(CH₂)_{y10}-(CO)-, при этом, y₉ представляет собой целое число, обычно от 1 до 24, и y₁₀ представляет собой целое число, обычно от 1 до 3) или аминокислота с малым заместителем, при этом, например, R⁵ выбран из Водорода, низшего алкила или низшего алкила, содержащего гидроксил, и предложен для увеличения расстояния или гибкости остова полимера. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁵,



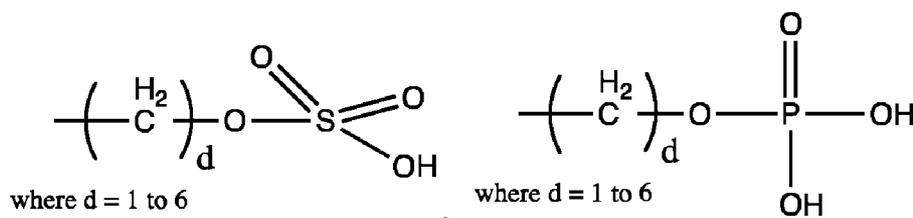
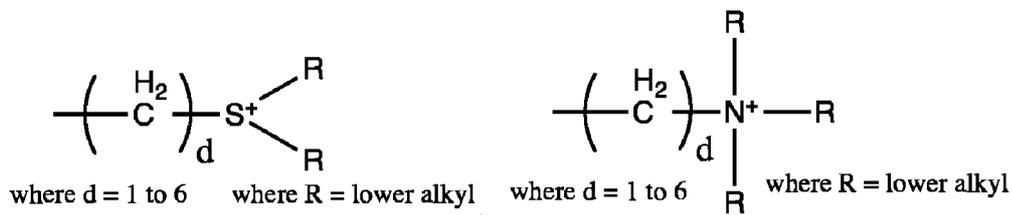
включенный в Формулу II, может быть выбран из



[00291] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит дополнительные сомомеры, n, которые выбраны из любой природной или неприродной аминокислоты, при этом, R⁶ выбран из любой группы, содержащей функциональную группу, которая несет заряд либо постоянно, либо при определенном pH. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁶, включенный в Формулу II, может быть выбран из



where d = 1 to 6 , where d = 1 to 6 , where d = 1 to 6 ,



где d = 1-6, где d = 1-6, где d = 1-6,

где d = 1-6, где R = низший алкил, где d = 1-6, где R = низший алкил,

где d = 1-6, d = 1-6.

[00292] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит дополнительные сомомеры, о, которые выбраны из любой природной или не природной аминокислоты, при этом, Лиганд сцеплен, посредством любого подходящего линкера, X, с мономером, о. Лиганд может представлять собой Лиганд с адьювантными свойствами. Лиганд, сцепленный с поли(аминокислотами) Формулы II, может быть гидрофобным, гидрофильным, амфифильным, заряженным или нейтральным по свойствам. Полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II, содержащий мономер о, может дополнительно содержать мономерные звенья l, m и n, которые компенсируют свойства Лиганда, присоединенного к мономеру о.

[00293] В полимерах на основе поли(аминокислот) Формулы II, количество повторов мономера обозначено как l, m, n и o, при этом, сумма l, m, n и o обычно представляет собой любое целое число от 3 до 300. Каждый из различных типов мономеров, l, m, n или o, может быть одинаковым или различным. Мономеры, обозначенные как «l», наделяют полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II гидрофобными свойствами, то есть, превращают полимер в нерастворимую в воде гидрофобную молекулу (Н). Гидрофобные мономеры, l, могут быть одинаковыми или

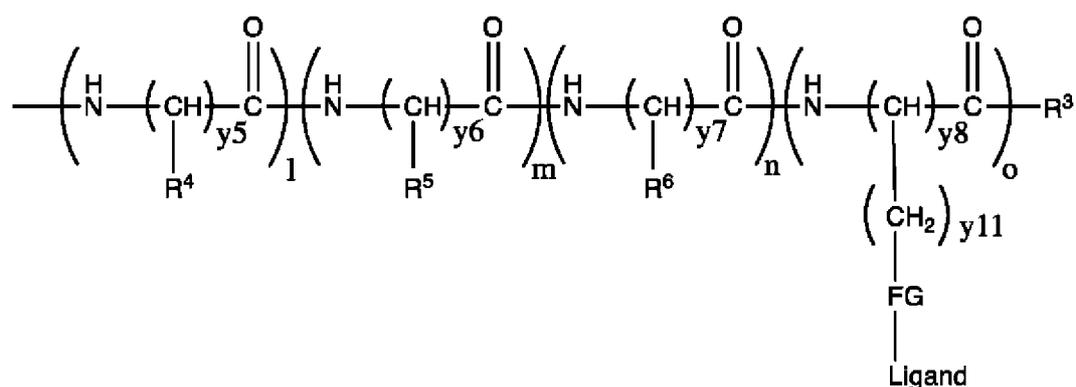
различными и обычно содержат ароматическое кольцо. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные мономеры, 1, содержат гетероциклическое и/или аминзамещенное ароматическое кольцо. Дополнительные сомомеры, обозначенные как «m», могут применяться для увеличения гибкости или расстояния между различными мономерами, содержащими остов полимера. Дополнительные сомомеры, обозначенные «n», содержат заряженные функциональные группы. Дополнительный сомономер, обозначенный как «o», применяются для присоединения Лиганда, такого как, агонист PRR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, сцепленный с мономером, o, посредством любого подходящего линкера, представляет собой агонист PRR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, мономер, o, сцеплен с Лигандом, который несет положительный или отрицательный заряд, и примыкает к мономеру, n, противоположного заряда. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженный сомономер, n, расположен в примыкании к сомономеру, o, содержащему функциональную группу противоположного заряда функциональной группы, содержащей сомономер n, и противоположные заряды приводят к нулевому суммарному заряду, таким образом, мономер n функционирует для нейтрализации заряда, переносимого Лигандом, присоединенным к мономеру o.

[00294] Процентное содержание мономеров, 1, m, n и o, содержащих полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II, зависит от специфического применения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II состоит полностью из мономера 1. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II состоит из сомономеров, 1 и o, таких как, мономер 1 с 5-95 моль % и мономер o с, примерно, 95-5 моль %. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит сомомеры, 1 и m, при этом, m обеспечивает пространство, то есть, расстояние между гидрофобными мономерами, 1, и может снижать жесткость полимера. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит мономеры, 1, m и o, при этом, мономеры m обеспечивают пространство между объемными заместителями, содержащими мономеры 1 и o. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит мономеры, 1 и o, и дополнительные мономеры m и n, при этом, мономер n применяется для модуляции заряда остова полимера. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II состоит

полностью из мономеров m и o. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II состоит полностью из мономеров m, n и o или только из n и o. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит мономеры l, m, n и o.

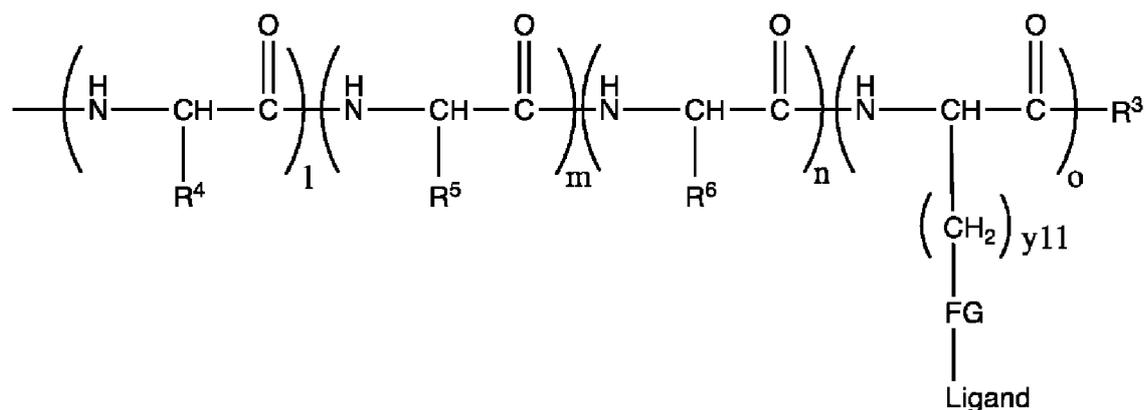
[00295] Если полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II содержит адъювант, то процентное содержание мономеров, содержащих полимер, представленный мономером o, который сцеплен с адъювантом посредством любого подходящего линкера, обычно составляет от 10 до 60%, например, от 2 до 12 аминокислот полимера, длина которого составляет 20 аминокислот, представляющего собой мономер o. В некоторых вариантах осуществления полимеров на основе поли(аминокислот) Формулы II настоящего изобретения, l представляет собой преобладающее мономерное звено. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, полимер на основе поли(аминокислоты) Формулы II состоит полностью из l мономера, то есть, все мономеры представляют собой l мономер, при необходимости, при этом, адъювант присоединен к концу поли(аминокислоты), либо непосредственно, либо опосредованно, посредством второго полимера или посредством любой подходящей линкерной молекулы.

[00296] Если полимер Формулы II представляет собой сополимер, содержащий o мономеры, то Лиганд может быть сцеплен с подвешенными функциональными группами (FG), распределенными вдоль остова полимера, как это показано ниже:



при этом, y11 обозначает количество метиленовых звеньев и представляет собой любое целое число, такое как, 0-6, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Функциональная группа (FG) представляет собой любую подходящую функциональную группу, включая амин, карбоновую кислоту, тиол, гидроксил, азид, алкин, гидразин, альдегид или кетон, которые обеспечивают присоединение, то есть, сцепление, Лиганда, либо непосредственно, либо посредством линкера.

[00297] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, у5, у6, у7 и у8 равны 1, а полимер Формулы II имеет вид:



[00298] Лиганды с адъювантными свойствами могут быть сцеплены с любой из гидрофобных молекул (H) настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганды с адъювантными свойствами сцеплены с полимерами Формулы II. Лиганды с адъювантными свойствами могут быть сцеплены с полимерами на основе поли(аминокислот) Формулы II посредством подвешенных функциональных групп (FG) на о мономерах; на концах полимера; или опосредованно, посредством другой молекулы или полимера, который привит к подвешенным функциональным группам (FG) или на концах полимера. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, функциональная группа (FG) мономеров о сцепляет Лиганды с адъювантными свойствами, или другие молекулы Лигандов, с остовом поли(аминокислоты) посредством ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, FG, содержащий мономер о Формулы II, может быть сцеплен со вторым полимером. FG, включенная в Формулу II, может быть выбрана из карбоновой кислоты, альдегида, кетона, амина, гидразина, тиола, азиды или алкина или из любой подходящей функциональной группы, которую можно применять для сцепления Лиганда или другого полимера с остовом полимера.

[00299] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы II сцеплен посредством Линкера (L) с пептидным антигеном (A), либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2), посредством вступления в реакцию предшественников линкера X1 и X2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы II сцеплен непосредственно (то есть, отсутствует Линкер (L)) с C-концом пептидного антигена (A) или с C-концом удлинения B2 посредством амидной связи. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы II сцеплен с предшественником линкера (X2), содержащим циклооктин (DBCO),

который вступает в реакцию с азидосодержащим предшественником линкера (X1), который сцеплен, либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A).

[00300] Поли(аминокислота) Формулы I или Формулы II представляет собой гидрофобную молекулу (H), которая может быть сцеплена, либо посредством N-концевого амина, C-концевой карбоновой кислоты, либо посредством необязательных боковых цепей, например, посредством функциональных групп сомономеров, непосредственно или опосредованно, посредством Линкера (L) или удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, поли(аминокислота) Формулы I или Формулы II представляет собой гидрофобную молекулу (H), которая сцеплена с пептидным антигеном (A), что приводит к пептидному антигенному конъюгату формулы [C]-[B1]-A-[B2]-[L]-H, или [B1]-A-[B2]-[L]-H(C), при этом, [] обозначает, что группа является необязательной.

[00301] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, поли(аминокислота) Формулы I или Формулы II представляет собой гидрофобную молекулу (H), которая сцеплена на N-конце с Линкером (L), который сцеплен с C-концевым удлинением (B2), который сцеплен с C-концом пептидного антигена (A), который сцеплен на N-конце с N-концевым удлинением (B1), которое сцеплено с заряженной молекулой (C).

[00302] Например: C-B1-A-B2-T-H

[00303] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) может быть сцеплена непосредственно с гидрофобной молекулой (H), состоящей из поли(аминокислоты) Формулы I или Формулы II, или посредством Линкера (L), который сцеплен с пептидным антигеном (A) посредством удлинения. В настоящем документе, для A-B₂-L(C)-H подразумевается, что скобочная запись указывает на то, что L сцеплено как с C, так и с H.

[00304] Например: A-B₂-L(C)-H или A-B₂-L-H(C)

[00305] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, поли(аминокислота) Формулы I или Формулы II представляет собой гидрофобную молекулу (H), которая сцеплена на N-конце с Линкером (L), который сцеплен как с необязательной заряженной (C) молекулой, так и с C-концевым удлинением (B2), которое сцеплено с C-концом пептидного антигена (A).

[00306] Например: A-B₂-(C-L)-H

[00307] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобный блок содержит поли(аминокислоту), при этом, Лиганд с адьювантными

свойствами присоединен к боковым группам, распределенным вдоль остова поли(аминокислоты). Лиганд с адьювантными свойствами может быть либо гидрофобным, либо гидрофильным, заряженным или незаряженным по свойствам. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд с адьювантными свойствами представляет собой агонист PRR.

[00308] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд с адьювантными свойствами может представлять собой агонист паттерн-распознающего рецептора (PRR). Неограничивающие примеры агонистов паттерн-распознающего рецептора (PRR) включают следующее: агонисты TLR-1/2/6 (например, липопептиды и гликолипиды, такие как, липопептиды Pam2cys или Pam3cys); агонисты TLR-3 (например, dsPНК, такая как, PolyI:C, и аналоги нуклеотидных оснований); агонисты TLR-4 (например, производные липополисахарида (LPS), например, монофосфориллипид A (MPL) и малая молекула являются производным или аналогом пиримидоиндола); агонисты TLR-5 (например, флагеллин); агонисты TLR-7 и -8 (например, аналоги ssPНК и нуклеотидных оснований, включая производные имидазохинолинов, гидроксиденина, бензонафтиридина и локсорибина); и агонисты TLR-9 (например, метилированные CpG); агонисты стимулятора генов интерферона (STING) (например, циклические динуклеотиды, такие как, циклический диаденилатмонофосфат); агонисты рецептора лектина С-типа (CLR) (такие как, различные моно-, ди-, три- и полимерные сахара, которые могут быть линейными или разветвленными, например, манноза, трисахариды Льюиса-X и так далее); агонисты RIG-I-подобного рецептора (RLR); и агонисты NOD-подобного рецептора (NLR) (такие как, пептидогилканы и структурные мотивы из бактерий, например, мезодиаминопимелиновая кислота и мурамилдипептид); и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, агонист паттерн-распознающего рецептора может представлять собой агонист TLR, такой как, агонист TLR-7/8 на основе имидазохинолина. Например, Лиганд с адьювантными свойствами может представлять собой имиквимод (R837) или резиквимод (R848), которые одобрены FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США) для применения человеком.

[00309] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд с адьювантными свойствами может представлять собой агонист TLR-7, агонист TLR-8 и/или агонист TLR-7/8. Известно множество таких агонистов, включая множество различных соединений имидазохинолина.

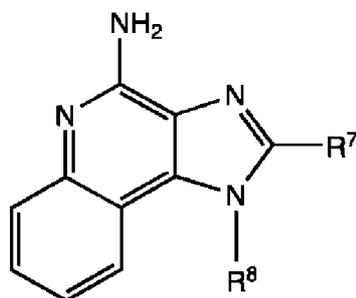
[00310] Имидазохинолины применяются в способах, раскрытых в настоящем документе. Имидазохинолины представляют собой синтетические иммуномодулирующие

лекарственные препараты, которые действуют, связывая Толл-подобные рецепторы 7 и 8 (TLR-7/TLR-8) с антигенпрезентирующими клетками (например, дендритными клетками), структурно имитируя природный лиганд этих рецепторов, вирусную одноцепочечную РНК. Имидазохинолины представляют собой гетероциклические соединения, содержащие конденсированный хинолин-имидазольный каркас. Производные, соли (включая гидраты, сольваты и N-оксиды) и их пролекарства также рассматриваются в настоящем изобретении. Конкретные соединения имидазохинолина известны в данной области техники, см., например, Патент США № 6,518,265; и Патент США № 4,689,338. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления настоящего изобретения, соединение имидазохинолина не является имиквимодом и/или не является резиквимодом.

[00311] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд с адьювантными свойствами может представлять собой малую молекулу, имеющую 2-аминопиридин, слитый с пятичленным азотсодержащим гетероциклическим кольцом, включая, но этим не ограничиваясь, имидазохинолинамины и замещенные имидазохинолинамины, такие как, например, амидозамещенные имидазохинолинамины, сульфонамидзамещенные имидазохинолинамины, карбамидзамещенные имидазохинолинамины, арилэфирзамещенные имидазохинолинамины, гетероциклэфирзамещенные имидазохинолинамины, амидоэфирзамещенные имидазохинолинамины, сульфонамидэфирзамещенные имидазохинолинамины, карбамидзамещенные имидазохинолиновые эфиры, тиоэфирзамещенные имидазохинолинамины, гидроксилзамещенные имидазохинолинамины, оксимзамещенные имидазохинолинамины, 6-, 7-, 8- или 9-арил, гетероарил, арилокси или арилалкиленоксизамещенные имидазохинолинамины, и имидазохинолиновые диамины; тетрагидроимидазохинолиновые амины, включая, но этим не ограничиваясь, амидные замещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, сульфонамидзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, карбамидзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, арилэфирзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, гетероциклэфирзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, амидоэфирзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, сульфонамидоэфирзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, карбамидзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые эфиры, тиоэфирзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, гидроксилзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, оксимзамещенные тетрагидроимидазохинолиновые амины, и тетрагидроимидазохинолиновые диамины;

имидазопиридиновые амины, включая, но этим не ограничиваясь, амидзамещенные имидазопиридиновые амины, сульфонамидзамещенные имидазопиридиновые амины, карбамидзамещенные имидазопиридиновые амины, арилэфирзамещенные имидазопиридиновые амины, гетероциклэфирзамещенные имидазопиридиновые амины, амидоэфирзамещенные имидазопиридиновые амины, сульфонамидоэфирзамещенные имидазопиридиновые амины, карбамидзамещенные имидазопиридиновые эфиры, и тиоэфирзамещенные имидазопиридиновые амины, 1,2-мостиковые имидазохинолинамины; 6,7-слитые циклоалкилимидазопиридиновые амины; имидазонафтиридиновые амины; тетрагидроимидазонафтиридиновые амины; оксазолопиридиновые амины; тиазолопиридиновые амины; оксазолонфтиридиновые амины; тиазолонфтиридиновые амины; пиразолопиридиновые амины; пиразолохинолиновые амины; тетрагидропиразолохинолиновые амины; пиразолонфтиридиновые амины; тетрагидропиразолонфтиридиновые амины; и 1Н-имидазо димеры, слитые с пиридинаминами, хинолинамины, тетрагидрохинолиновые амины, нафтиридиновые амины или тетрагидронафтиридиновые амины.

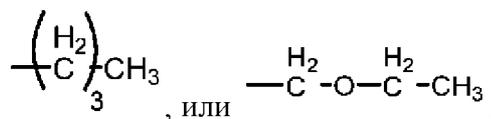
[00312] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, лиганд с адьювантными свойствами представляет собой имидазохинолин с формулой:



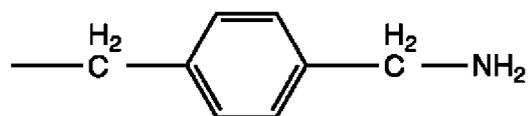
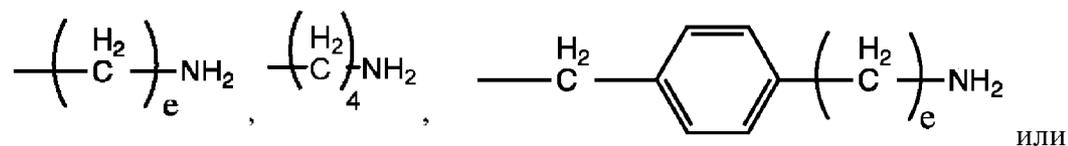
Формула III

[00313] В Формуле III, R⁷ выбран из одного из следующих: водород, необязательно замещенный низший алкил или необязательно замещенный низший эфир; а R⁸ выбран из одного из следующих: необязательно замещенный ариламин или необязательно замещенный низший алкиламин. R⁸ может быть необязательно замещен линкером, который спецляется с полимером. Неожиданным открытием был тот факт, что в некоторых соединениях, при этом, R⁸ был выбран из низшего алкиламина, в то время как соединение было менее активным, чем R⁸, выбранный из ариламина, качество ответа улучшилось. Таким образом, Адьюванты с умеренной активностью Формулы III привели к более качественным ответам. Примечание: Адьюванты Формулы III представляют собой тип Лиганда и могут именоваться как Адьюванты Формулы III или Лиганды с адьювантными свойствами.

[00314] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁷, включенный в Формулу III, может быть выбран из водорода,

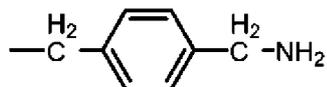


[00315] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁸ может быть выбран из,



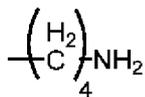
, при этом, e обозначает количество метиленовых звеньев, представляющих собой целое число от 1 до 4.

[00316] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁸ может



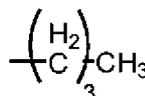
представлять собой

[00317] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁸ может

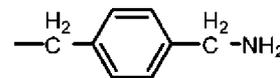


представлять собой

[00318] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, R⁷ может

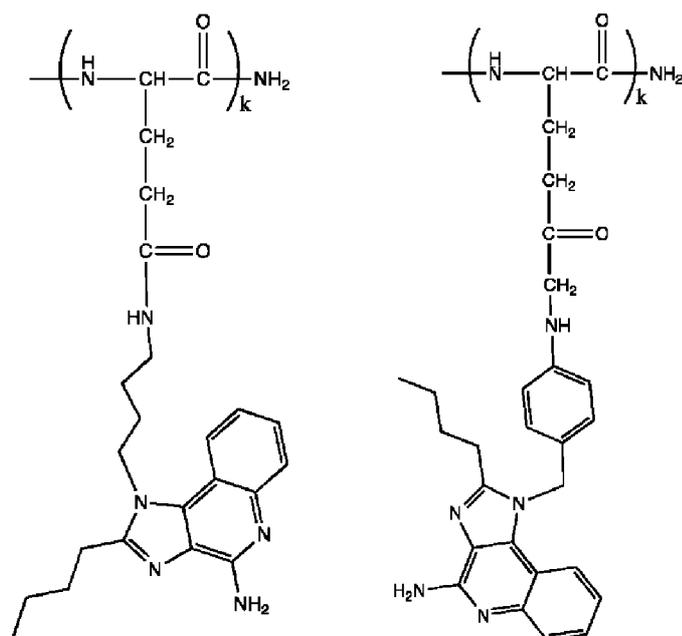


представлять собой



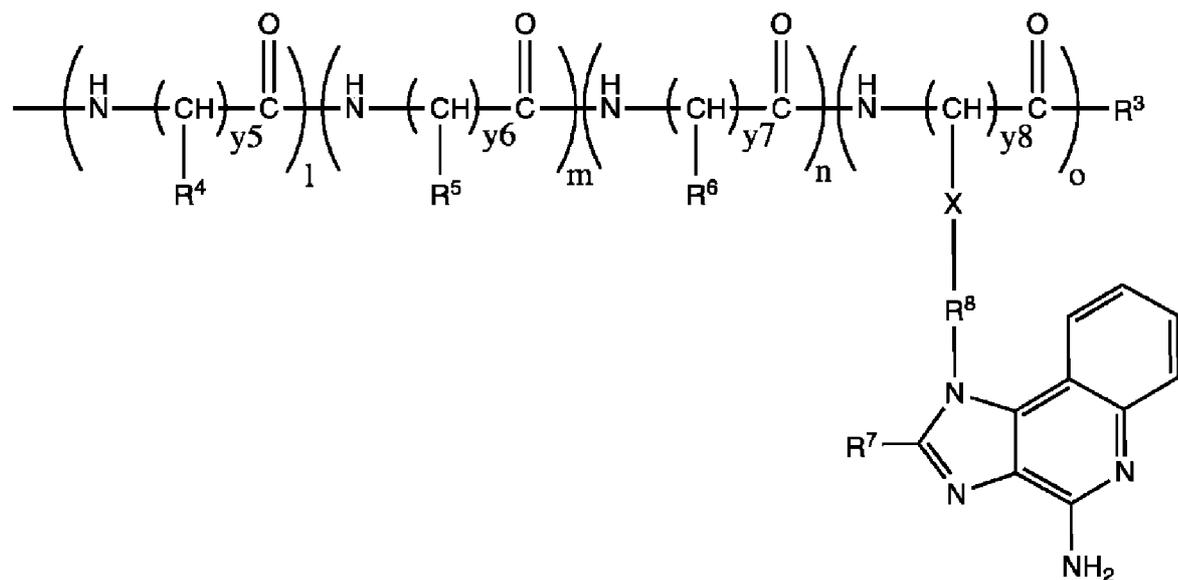
, и R⁸ может представлять собой

[00319] Неограничивающие примеры гидрофобных молекул (H), состоящих из поли(аминокислот) Формулы I, сцепленных с адьювантами Формулы III, включают:

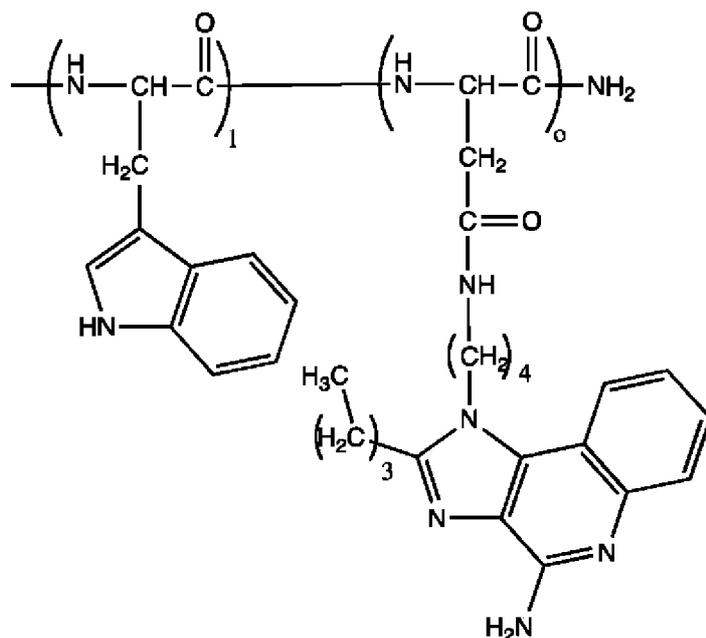


при этом, k составляет 3-300. Например, когда $k = 5$, пептид состоит из 5 аминокислот, сцепленных с Адьювантами Формулы III. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные молекулы (H), состоящие из поли(аминокислот) Формулы I, сцепленных с адьювантами Формулы III, могут быть сцеплены, либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L) и/или удлинения (либо B1, либо B2) с пептидным антигеном (A), который необязательно сцеплен с заряженной молекулой (C) посредством любых подходящих средств для образования пептидного антигенного конъюгата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, сцеплен непосредственно с C-концом пептидного антигена (A) или с C-концом удлинения B2 посредством амидной связи. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, сцеплен с предшественником линкера (X2), способным к клик-химии, например, с алкином или DBCO, или с предшественником линкера X2, являющимся реакционноспособным по отношению к тиолу, например, с малеимидом, который вступает в реакцию с предшественником линкера X2, который сцеплен, непосредственно или посредством удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X1 DBCO присоединен к N-концу поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, и применяется для вступления в реакцию с предшественником линкера X2, несущим азид, который сцеплен, либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A).

[00320] Неограничивающий пример гидрофобной молекулы (H), состоящей из поли(аминокислот) Формулы II, сцепленных с адьювантами Формулы III, включает:



[00321] Например:



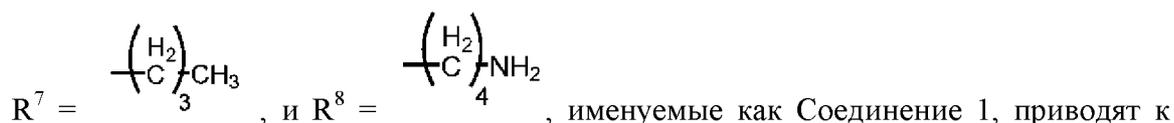
при этом, сомономер 1 обычно представляет собой целое число от 3 до 300, а необязательный сомономер о обычно представляет собой целое число от 3 до 300 аминокислотных остатков, при этом, сумма 1 и о обычно составляет от 3 до 300. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, о равно 0, и полимер полностью состоит из 1, то есть, полимер представляет собой полимер поли(триптофан), который не сцеплен с адьювантами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы II, сцепленной с адьювантами Формулы III, сцеплен, либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера

(L) и/или удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A) посредством любых подходящих средств. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы II, сцепленной с Адьювантами Формулы III, сцеплен непосредственно с C-концом пептидного антигена (A) или с C-концом удлинения B2 посредством амидной связи. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец поли(аминокислоты) Формулы II, сцепленной с адьювантами Формулы III, сцеплен с предшественником линкера X2, способным к клик-химии, например, с DBCO, или с предшественником линкера X2, являющимся реакционноспособным по отношению к тиолу, например, с малеимидом, который вступает в реакцию с предшественником линкера X1, который сцеплен, либо непосредственно, либо посредством удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, предшественник линкера X2 DBCO присоединен к N-концу поли(аминокислоты) Формулы II, сцепленной с Адьювантами Формулы III, и применяется для вступления в реакцию с предшественником линкера X1, несущим азидидную функциональную группу.

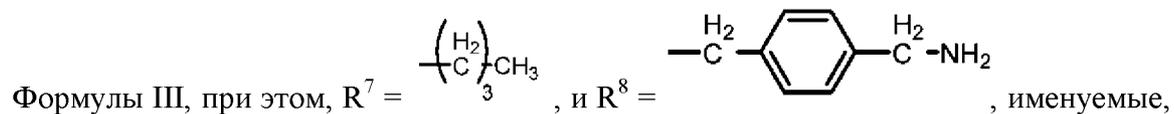
[00322] Неожиданное открытие, раскрытое в настоящем документе, заключается в том, что длина, то есть, количество мономерных звеньев, поли(аминокислот) либо Формулы I, либо Формулы II, сцепленных с адьювантами Формулы III, содержащими гидрофобную молекулу (H) пептидных антигенных конъюгатов, является основной детерминантой, которая влияет на интенсивность Т-клеточных ответов, генерируемых против пептидного антигена (A). Соответственно, было установлено, что пептидные антигенные конъюгаты, состоящие из гидрофобных молекул (H), состоящих из поли(аминокислот) Формулы I или Формулы II с, по меньшей мере, 5 мономерными звеньями, стимулируют более высокое качество и интенсивность Т-клеточных ответов, по сравнению с поли(аминокислотами) той же формулы, которые имеют длину менее 5 аминокислот. Дополнительным открытием стал тот факт, что количество Адьювантов Формулы III, сцепленных с поли(аминокислотами) Формулы I или Формулы II, также оказывало влияние на интенсивность генерируемого иммунного ответа, причем пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобные молекулы (H) Формулы I или II, содержащие, по меньшей мере, 3 Адьюванта Формулы III, приводят к более высокой интенсивности Т-клеточных ответов, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, содержащими гидрофобные молекулы (H) Формулы I или II, содержащие менее 3 Адьювантов Формулы III. Неограничивающие объяснения этих открытий заключаются в том, что увеличенная длина гидрофобной молекулы (H) Формулы I или Формулы II, сцепленной с адьювантами Формулы III, обеспечивает образование мицелл

или других надмолекулярных структур при сцеплении даже с гидрофильными пептидными антигенами, и в том, что такое образование частиц приводит к улучшенным иммунным ответам, возможно, благодаря улучшенной фармакокинетике и клеточному поглощению, что характерно для частиц, но не для растворимых материалов. Дополнительное неограничивающее объяснение состоит в том, что увеличение длин гидрофобной молекулы (Н), состоящей из поли(аминокислот) Формулы I или Формулы II, сцепленных с адьювантами Формулы III, приводит к улучшенной стабильности, например, к кинетической стабильности, частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами в водном буферном растворе; улучшенная стабильность частиц обеспечивает то обстоятельство, что частица остается интактной, что, тем самым, задерживает клиренс (либо почечный, либо печеночный) пептидных антигенных конъюгатов, содержащих частицы и стимулирующих поглощение антигенпрезентирующими клетками.

[00323] Дополнительным неожиданным открытием, раскрытым в настоящем документе, является тот факт, что активность Адьюванта Формулы III, сцепленного с поли(аминокислотами) Формулы I или Формулы II, содержащими гидрофобные молекулы (Н) пептидных антигенных конъюгатов, оказалась обратно пропорциональна интенсивности и широте Т-клеточных ответов, генерируемых против пептидных антигенов после многократной иммунизации. Соответственно, мы показываем, как это раскрыто в настоящем документе, что поли(аминокислоты) Формулы I сцеплены с адьювантами Формулы III, при этом,

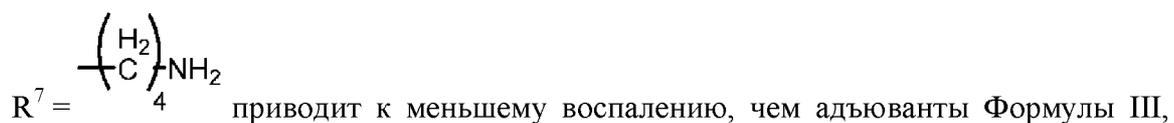


более высокой интенсивности и широте Т-клеточных ответов, по сравнению с поли(аминокислотами) Формулы I, сцепленными с адьювантами

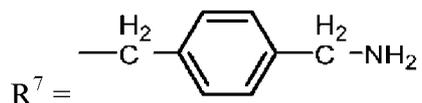


как Соединение 2.

[00324] Неограничивающим объяснением является тот факт, что более низкая активность адьювантов Формулы III, при этом,

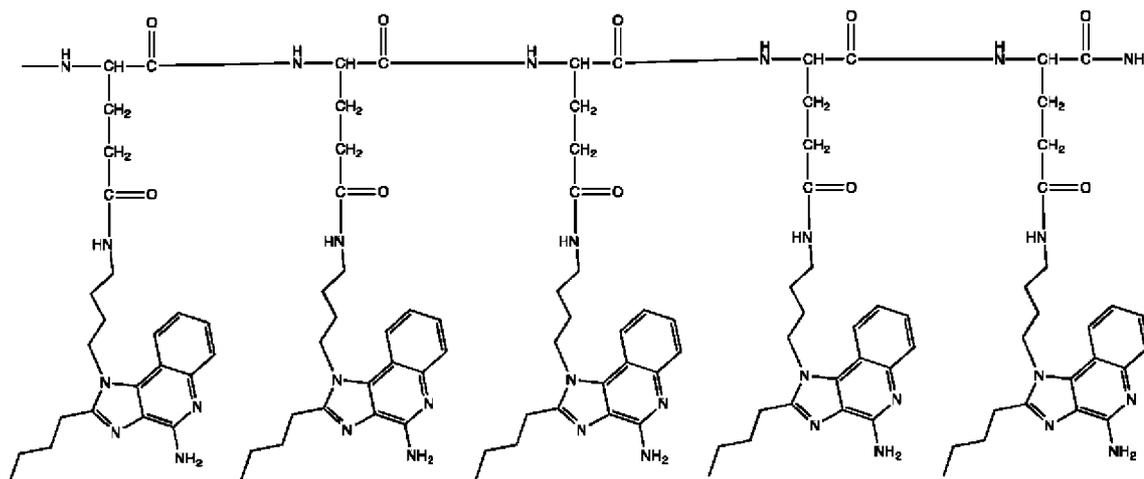


при этом,

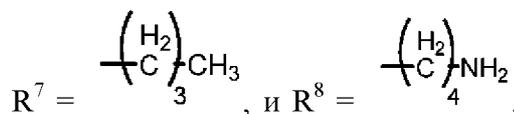


и тот факт, что умеренное воспаление, индуцируемое агонистами с более низкой активностью, приводит к меньшему истощению Т-клеточных ответов, предлагая более высокую интенсивность и широту Т-клеточных ответов в целом.

[00325] На основании этих открытий, предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения для гидрофобных молекул (Н), состоящих из поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, является:

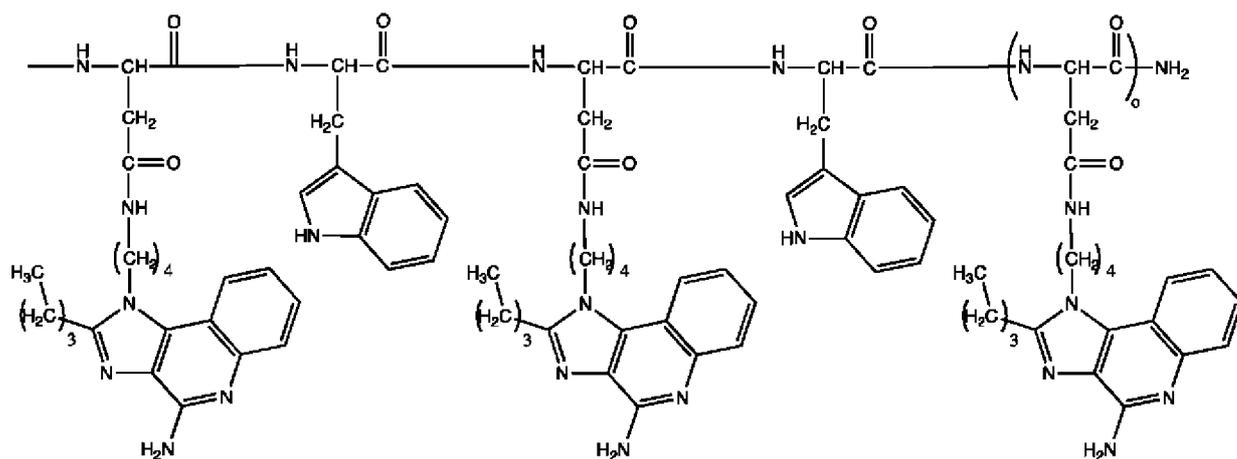


[00326] В настоящем документе, мы сообщаем о неожиданном открытии того факта, что гидрофобные молекулы (Н) на основе поли(аминокислот) Формулы II, сцепленных с адьювантами Формулы III, приводят к значительному увеличению интенсивности и качества Т-клеточных ответов, когда полимер поли(аминокислоты) состоит из от 5 до 10 аминокислот, при этом, от 60 до 100% сополимера состоит из сомономера о, сцепленного с адьювантами Формулы III, при этом,



Соединение 1. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, сомономер о содержит от 20 до 60% мономерных звеньев поли(аминокислот) Формулы II, например, 60%.

[00327] Например:



[00328] Неожиданные данные, раскрытые в настоящем документе, свидетельствуют о том, что длина полимера, содержащего гидрофобную молекулу (H), а также количество и активность присоединенных Лигандов с адьювантными свойствами (то есть, агонистов TLR-7/8 Формулы III) являются основными детерминантами интенсивности и качества иммунных ответов, генерируемых против пептидных антигенов (A), доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов. Эти данные предполагают, что гидрофобные молекулы (H), состоящие из поли(аминокислот), которые состоят из гидрофобных аминокислот и/или аминокислот, сцепленных с Лигандами, должны быть достаточно длинными, чтобы допустить образование частиц при сцеплении с любым пептидным антигеном (A), включая высокогидрофильные пептидные антигены (A), которые будут противодействовать тенденции гидрофобной молекулы (H) на основе поли(аминокислоты) управлять сборкой частиц. Поли(аминокислоты) недостаточной длины, например, длиной менее 3 аминокислот, могут не предложить площадь гидрофобной поверхности, достаточную для стимулирования образования частиц в водных условиях, когда они сцеплены с определенными пептидными антигенами, в частности, с гидрофильными пептидными антигенами с высокой плотностью заряда. Следовательно, как раскрыто в настоящем документе, поли(аминокислоты) Формулы I или Формулы II должны иметь длину более 3 аминокислот, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, от 5 до 30 аминокислот, например 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 или 30 аминокислот в длину. Более длинные поли(аминокислоты), такие как, поли(аминокислоты), содержащие более 30 аминокислот, такие как, длиной, примерно, 30, 40 или 50 аминокислот, могут быть сгенерированы, например, путем твердофазного пептидного синтеза. В качестве альтернативы твердофазному пептидному синтезу, могут быть применены реакции растворной полимеризации для генерирования длинноцепочечных поли(аминокислот), состоящих из гидрофобных мономеров.

[00329] В настоящем документе, мы раскрываем дополнительное неожиданное открытие, заключающееся в том, что Соединение 1, которое обладает определенной активностью *in vitro* в отношении активности TLR-7 (то есть, EC50), составляющей 108 нМ, приводит к улучшенным Т-клеточным ответам после повторных иммунизаций, по сравнению с более активным агонистом, Соединением 2, которое обладает определенной активностью *in vitro* в отношении активности TLR-7 (то есть, EC50), составляющей 18,7 нМ. Эти данные предполагают, что активность адъювантов, включенных в иммуногенную композицию, можно модулировать для оптимизации иммунных ответов, и что природная активация иммунитета адъювантом может быть умеренной с тем, чтобы предложить соответствующий уровень стимуляции, необходимый для оптимизации Т-клеточного иммунитета. Уровень природной стимуляции иммунитета можно сделать умеренным путем доставки нескольких, например, по меньшей мере, 3, агонистов с умеренной активностью (то есть, агонистов с EC50 > 100 нМ) на пептидных антигенных конъюгатах или путем доставки менее 3 агонистов с высокой активностью (то есть, агонистов с EC50 < 100 нМ).

[00330] Активность различных TLR-7, TLR-8 и комбинированных агонистов TLR-7 и -8 можно легко установить из литературы. Были описаны агонисты TLR-7 и TLR-7/8 на основе имидазохинолина и аденина (см.: Шукла, и др., J. Med. Chem., 53:4450-4465, 2010 и Герстер, и др., J. Med. Chem., 2005, Патент США № 6,069,149, и Хирота, и др., J. Med. Chem., 45:5419-5422, 2002, которые включены в настоящее описание посредством ссылки), и эти работы свидетельствуют, что линкеры ароматических соединений, такие как, линкеры бензила и ксилила, выбранные для R² адъювантов Формулы III, приводят к соединениям с повышенной активностью в отношении TLR-7, по сравнению со сравнимым соединением, где R² адъювантов Формулы III выбран из низшего алкила.

[00331] На основании неожиданных открытий, описанных в настоящем документе, предпочтительные варианты осуществления гидрофобных молекул (H) по настоящему изобретению, состоящих из поли(аминокислот) Формулы I или Формулы II, сцепленных с адъювантами Формулы III, обычно имеют длину от 5 до 30 аминокислот, при этом, плотность сомономеров, сцепленных с адъювантами Формулы III, составляет от 20 до 100 моль %. При необходимости, когда Адъювант Формулы III включает R⁸, выбранный из низшего алкила, например, Соединения 1, плотность аминокислот, сцепленных с Соединением 1, должна составлять от 40 до 100%, например, 60%. При необходимости, когда Адъювант Формулы III включает R⁸, выбранный из ароматического соединения, например, Соединения 2, плотность аминокислот, сцепленных с Соединением 2, должна

составлять менее 20% или 1-2 молекулы Соединения 2, доставляемые на каждом полимере.

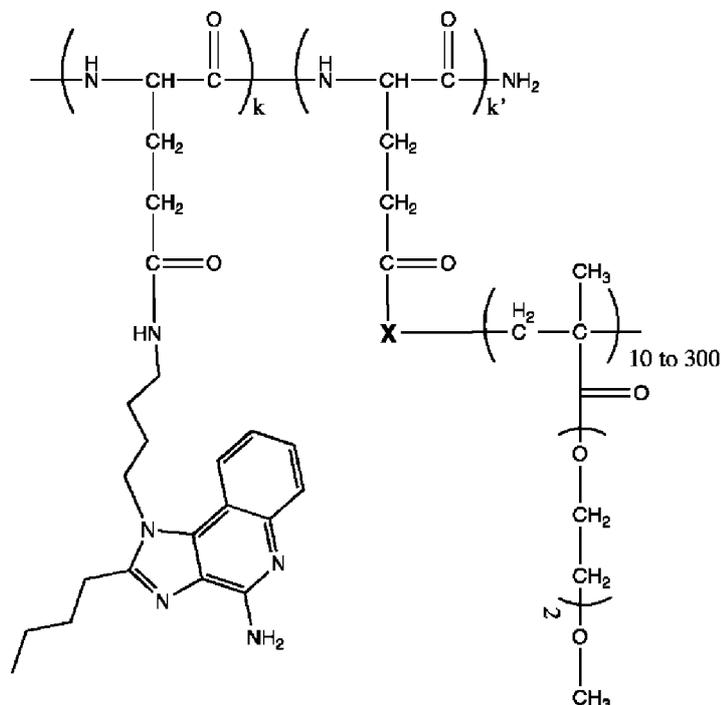
[00332] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, плотность адьювантов Формулы III, сцепленных с полимерами с молекулярной массой менее, примерно, 10000 г/моль и на основе сомономеров, выбранных из следующего: N-2-гидроксипропил(метакриламид) (HPMA), гидроксиэтил(метакрилат) (HEMA), стирол, винилпирролидон (PVP), N-изопропилакриламид (NIPAAm); N-изопропилметакриламид (NIPMAm); N,N'-диэтилакриламид (DEAAm); N-(L)-(1-гидроксиметил)пропилметакриламид (HMPMAm); N,N'-диметилэтилметакрилат (DMEMA), 2-(2-метоксиэтокси)этилметакрилат (DEGMA) или замещенные поли(фосфоэферы), составляет, примерно, от 5 до 100 моль %, например, плотность адьюванта, присоединенного к полимеру, может составлять, примерно, 5–6%, примерно, 6–7%, примерно, 8–9%, примерно, 9–10%, примерно, 10–11%, примерно, 11–12%, примерно, 12–13%, примерно, 13–14%, примерно, 15–16%, примерно, 17–18%, примерно, 18–20%, примерно, 25%, примерно, 30%, примерно, 40%, примерно, 50%, примерно, 60%, примерно, 70%, примерно, 80%, примерно, 90% или, примерно, 100%.

[00333] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, плотность адьювантов Формулы III, сцепленных с полимерами с молекулярной массой выше, примерно, 10000 г/моль и на основе сомономеров, выбранных из следующего:

N-2-гидроксипропил(метакриламид) (HPMA), гидроксиэтил(метакрилат) (HEMA), стирол, винилпирролидон (PVP), N-изопропилакриламид (NIPAAm); N-изопропилметакриламид (NIPMAm); N,N'-диэтилакриламид (DEAAm); N-(L)-(1-гидроксиметил)пропилметакриламид (HMPMAm); N,N'-диметилэтилметакрилат (DMEMA), 2-(2-метоксиэтокси)этилметакрилат (DEGMA) или замещенные поли(фосфоэферы), составляет, примерно, от 1 до 25 моль%, например, плотность адьюванта, присоединенного к полимеру, может составлять, примерно, 1–2%, примерно, 2–3%, примерно, 3–4%, примерно, 5–6%, примерно, 6–7%, примерно, 7–8%, примерно, 8–9%, примерно, 9–10%, примерно, 10–11%, примерно, 11–12%, примерно, 13–14%, примерно, 14–15%, примерно, 16–17%, примерно, 17–18%, примерно, 19–20%, примерно, 20%, примерно, 21%, примерно, 22%, примерно, 23%, примерно, 24% или, примерно, 25%.

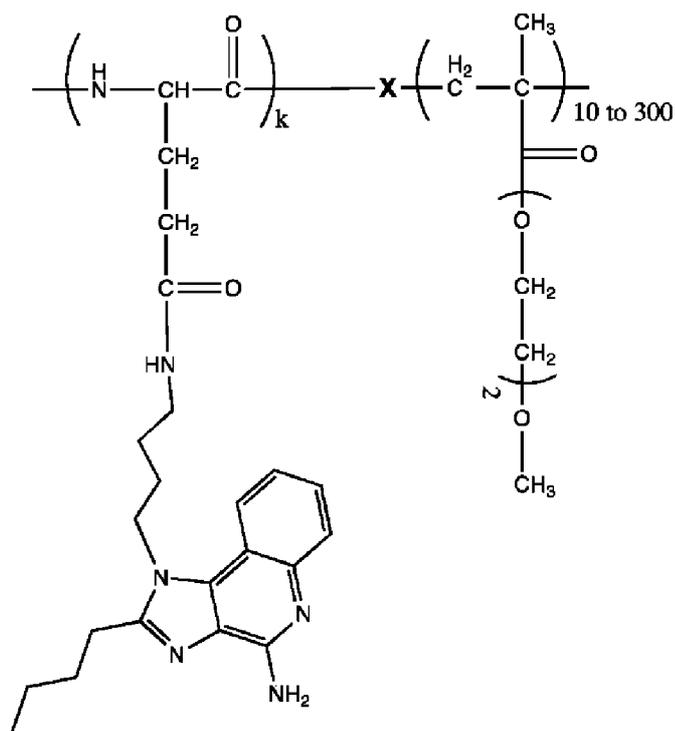
[00334] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, второй полимер, который состоит из гидрофобных и/или чувствительных к температуре мономеров, сцеплен с концевыми или боковыми группами поли(аминокислот) Формулы I или Формулы II, сцепленных с адьювантами Формулы III.

[00335] Неограничивающий пример гидрофобной молекулы (H), состоящей из чувствительного к температуре полимера на основе DEGMA, привитого к поли(аминокислоте) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, приведен в настоящем документе для ясности:



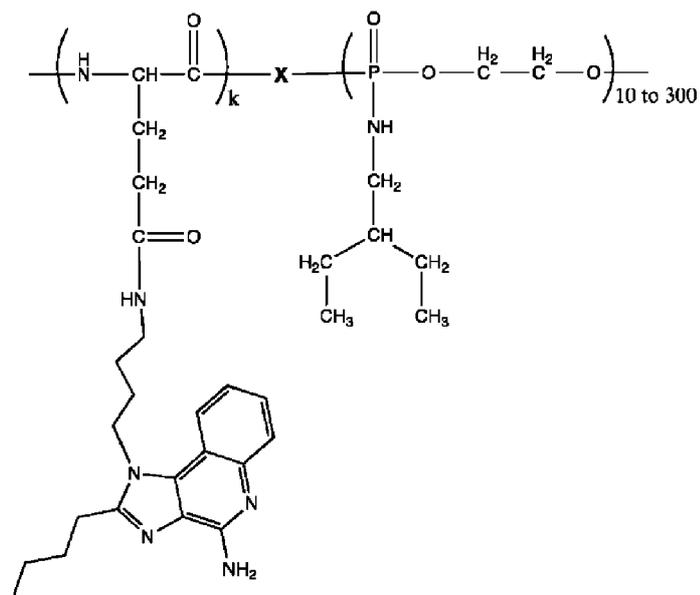
при этом, сомономер k обычно представляет собой целое число от 3 до 300, а сомономер k' обычно представляет собой целое число от 3 до 300 аминокислотных остатков, при этом, сумма k и k' обычно составляет от 3 до 300. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, k составляет, примерно, 3-10, а k' составляет, примерно, 1-10. Линкер X может представлять собой любую подходящую линкерную молекулу, и m обычно он составляет, примерно, 10-300 мономерных звеньев N-конец поли(аминокислоты) сцеплен, либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L) и/или удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A) посредством любых подходящих средств для образования пептидного антигенного конъюгата, который может дополнительно содержать заряженную молекулу (C).

[00336] Неограничивающий пример гидрофобной молекулы (H), состоящей из чувствительного к температуре полимера на основе DEGMA, сцепленного с концом поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, предложен в настоящем документе для ясности:



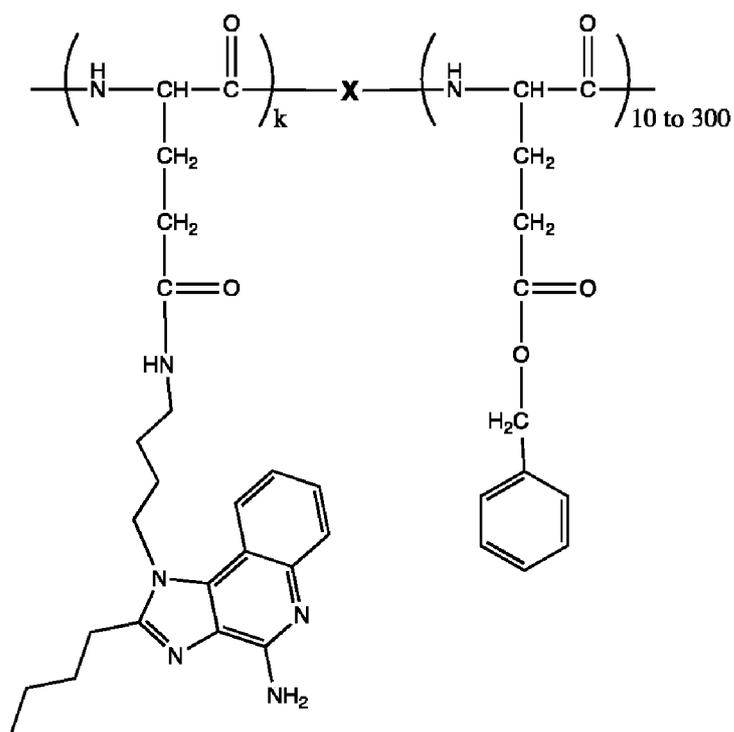
при этом, сомономер k обычно представляет собой целое число от 3 до 100 мономерных звеньев. Линкер, X , может представлять собой любую подходящую линкерную молекулу. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, k' составляет, примерно, 3-10 мономерных звеньев. N-конец поли(аминокислоты) сцеплен, либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L) и/или удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A) посредством любых подходящих средств для образования пептидного антигенного конъюгата, который может дополнительно содержать заряженную молекулу (C).

[00337] Неограничивающий пример гидрофобной молекулы (H), состоящей из полимера на основе полифосфоэфира, сцепленного с концом поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, приведен в настоящем документе для ясности:



при этом, сомономер k обычно представляет собой целое число от 3 до 100 мономерных звеньев. Линкер, X , может представлять собой любую подходящую линкерную молекулу. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, k составляет от 5 до 10 мономерных звеньев, а m составляет от 10 до 300 мономерных звеньев. N-конец поли(аминокислоты) сцеплен, либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L) и/или удлинения ($B1$ или $B2$), с пептидным антигеном (A) посредством любых подходящих средств для образования пептидного антигенного конъюгата, который может дополнительно содержать заряженную молекулу (C).

[00338] Неограничивающий пример гидрофобной молекулы (H), состоящей из полимера на основе поли(бензилглутамата), сцепленного с концом поли(аминокислоты) Формулы I, сцепленной с адьювантами Формулы III, приведен в настоящем документе для ясности:



при этом, сомономер k обычно представляет собой целое число от 3 до 100 мономерных звеньев, а m обычно представляет собой целое число от 50 до 300 аминокислотных остатков. Линкер, X , может представлять собой любую подходящую линкерную молекулу. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, x составляет от 5 до 10 мономерных звеньев, а m составляет от 10 до 300 мономерных звеньев. N-конец поли(аминокислоты) сцеплен, либо непосредственно, либо опосредованно, посредством Линкера (L) и/или удлинения (B1 или B2), с пептидным антигеном (A) посредством любых подходящих средств для образования пептидного антигенного конъюгата, который может дополнительно содержать заряженную молекулу (C).

[00339] В неограничивающем примере, пептидный антиген (A) сцеплен с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H) и может дополнительно содержать необязательные удлинения (B1 и/или B2) и необязательный Линкер (L), чтобы получить пептидный антигенный конъюгат Формулы IV, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной:

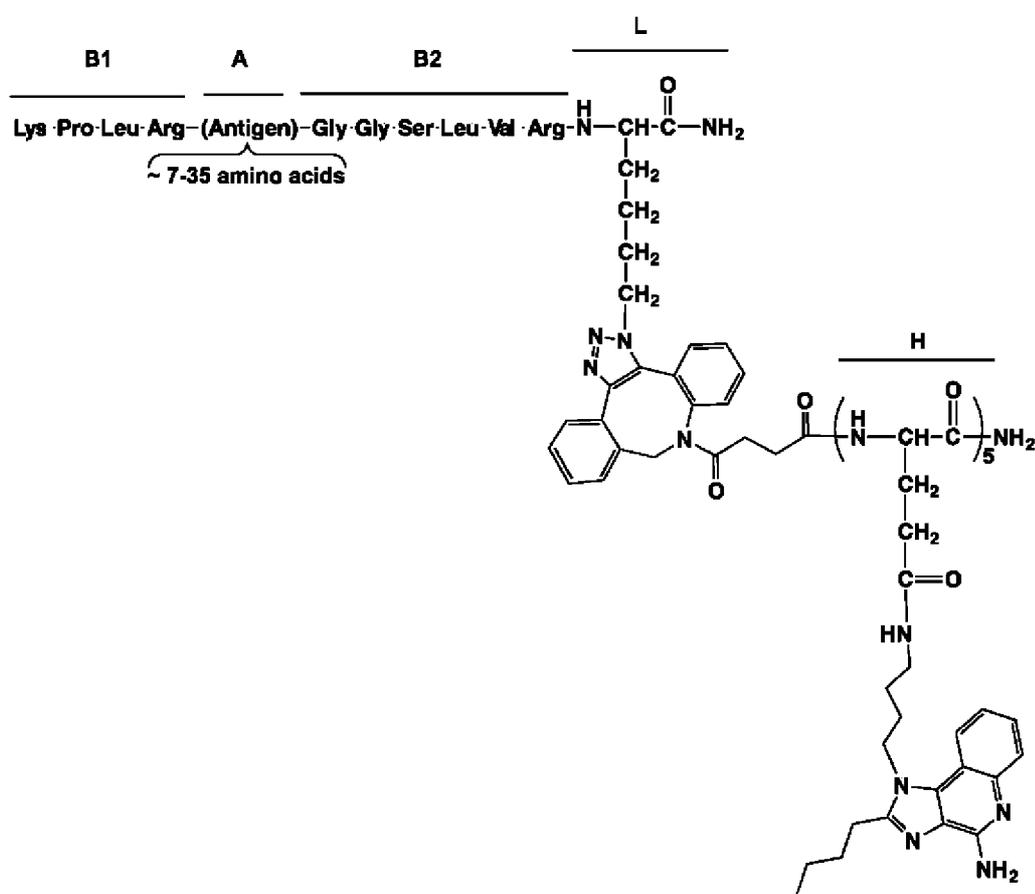


Формула IV

[00340] Пептидный антиген (A) Формулы IV состоит из целого числа аминокислот, n , при этом, n обычно составляет от 7 до 35, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот, а

гидрофобная молекула (H) обычно представляет собой поли(аминокислоту) Формулы I или II, сцепленную с Адьювантом Формулы III.

[00341] Неограничивающий пример пептидного антигенного конъюгата Формулы IV, состоящего из пептидного антигена (A), который необязательно сцеплен на N-конце с расщепляемыми катепсином удлинениями тетрапептида (B1 = Lys-Pro-Leu-Arg SEQ ID NO: 8) и на C-конце с комбинированной иммуно-протеасомой и расщепляемым катепсином удлинением гексапептида (B2 = Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 13), который сцеплен с триазольным линкером (L), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей из поли(аминокислоты) Формулы I, которая сцеплена с адьювантом Формулы III, показан в настоящем документе в качестве примера:



Необязательная заряженная молекула (C)

[00342] Раскрытые в настоящем документе пептидные антигенные конъюгаты состоят из пептидных антигенов (A), сцепленных с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H), и могут дополнительно содержать необязательные удлинения (B1 и/или B2), необязательный Линкер (L) и необязательную заряженную молекулу (C), при этом, C = обозначает заряженную молекулу, несущую функциональные группы, которые придают электростатический заряд. Раскрытые в настоящем документе иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигены, сцепленные с Частицей (P) или с

гидрофобной молекулой (Н), которые скапливаются в частицы в водных условиях, могут флокулировать без достаточного поверхностного заряда для стабилизации частиц. Таким образом, заряженные молекулы (С) могут быть необязательно сцеплены с пептидными антигенными конъюгатами в качестве средства для стабилизации частиц и предотвращения флокуляции; или, в альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, заряженные молекулы (С) могут быть включены в частицы, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, в качестве средства для стабилизированных частиц. Таким образом, цель заряженной молекулы (С) состоит в том, чтобы контролировать суммарный заряд частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, в качестве средства для стимуляции стабильности этих частиц.

[00343] Заряженная молекула (С) относится к любой молекуле, которая имеет, по меньшей мере, одну функциональную группу, которая положительно или отрицательно заряжена в водных буферных растворах при рН, примерно, 7,4. Функциональные группы, содержащие заряженную молекулу (С), могут представлять собой частичные или полные целочисленные значения заряда. Заряженная молекула (С) может представлять собой молекулу с единственной заряженной функциональной группой или с несколькими заряженными функциональными группами. Суммарный заряд заряженной молекулы (С) может быть положительным, отрицательным или нейтральным. Заряд функциональных групп, содержащих заряженную молекулу (С), может зависеть или не зависеть от рН раствора, в котором диспергирована заряженная молекула (С), как, например, в случае третичных аминов и четвертичных аммониевых соединений, которые являются рН-зависимыми и рН-независимыми, соответственно. Заряд молекулы может быть легко оценен на основе молекулярной структуры Льюиса и общепринятых способов, известных специалистам в данной области техники. Заряд может быть вызван индуктивными эффектами, например, связанные вместе атомы, имеющие различия в электронной аффинности, могут привести к полярной ковалентной связи, приводящей к атому с частичным отрицательным зарядом и к атому с частичным положительным зарядом. Например, азот, связанный с водородом, приводит к частичному отрицательному заряду на азоте и частичному положительному заряду на атоме водорода. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, атом в молекуле может считаться имеющим полное целочисленное значение заряда, когда количество электронов, присущих этому атому, меньше или равно атомному номеру этого атома. Заряд молекулы определяется суммированием заряда каждого атома, содержащегося в этой молекуле. Специалистам в данной области техники известен процесс оценки заряда молекулы путем суммирования формального заряда каждого атома в молекуле.

[00344] Заряженная молекула (С) может нести либо суммарный отрицательный, суммарный положительный, либо нейтральный заряд и зависит от суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата, необходимого для конкретного применения настоящего изобретения, раскрытого в настоящем документе. Например, известно, что большинство клеточных поверхностей несет суммарный отрицательный заряд. Таким образом, частицы с суммарным положительным зарядом могут взаимодействовать со всеми клеточными поверхностями без высокой степени специфичности. И наоборот, частицы с суммарным отрицательным зарядом будут электростатически отталкиваться от большинства клеточных поверхностей, но было показано, что они стимулируют селективное поглощение определенными антигенпрезентирующими клеточными популяциями. Например, было установлено, что положительно заряженные частицы, доставляемые внутривенно в кровоток, скапливаются в печени и легких, а также в антигенпрезентирующих клетках в селезенке, а также было установлено, что отрицательно заряженные частицы преимущественно скапливаются в антигенпрезентирующих клетках в селезенке после внутривенного введения. Таким образом, суммарный заряд заряженной молекулы (С) можно регулировать в соответствии с конкретными требованиями применения.

[00345] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) имеет суммарный отрицательный заряд и состоит из функциональных групп, которые несут отрицательный заряд при физиологической норме рН, при рН, примерно, 7,4. Подходящие заряженные молекулы (С), которые несут суммарный отрицательный заряд, включают молекулы, несущие функциональные группы (например, функциональные группы с рКа менее, примерно, 6,5), которые встречаются в виде конъюгатного основания кислоты при физиологической норме рН, при рН, примерно, 7,4. Они включают, но этим не ограничиваются, молекулы, несущие карбоксилаты, сульфаты, фосфаты, фосфорамидаты и фосфонаты. Заряженная молекула (С), несущая карбоксилат, может представлять собой, но этим не ограничивается, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, пировиноградную кислоту, молочную кислоту, гликолевую кислоту, глюкуроновую кислоту, цитрат, изоцитрат, альфа-кетоглутарат, сукцинат, фумарат, малат и оксалоацетат, и его производные. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, отрицательно заряженная молекула (С) состоит из молекулы с отрицательно заряженными функциональными группами, в количестве от 1 до 20, например, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 отрицательно заряженными функциональными группами, хотя, обычно, с отрицательно заряженными функциональными группами в

количестве не более 16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) представляет собой пептид поли(глутаминовой кислоты) длиной от 2 до 6 аминокислот. Ожидается, что последовательность поли(глутаминовой кислоты), состоящая из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, будет иметь отрицательный заряд -1, -2, -3, -4, -5 и -6 при pH 7,4, соответственно. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) представляет собой фосфосерин или сульфо-серин.

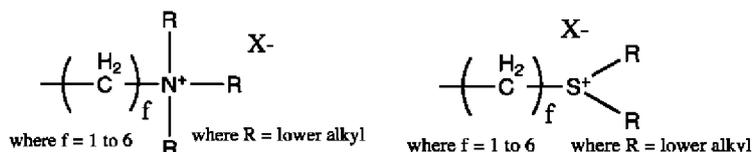
[00346] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) имеет суммарный отрицательный заряд и состоит из, по меньшей мере, 1 отрицательно заряженной аминокислоты. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) с суммарным отрицательным зарядом состоит из от 1 до 20 отрицательно заряженных аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В неограничивающем примере, заряженная молекула (C) состоит из 16 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 25) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -16; заряженная молекула (C), состоящая из 15 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 26) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -15; заряженная молекула (C), состоящая из 14 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 27) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -14; заряженная молекула (C), состоящая из 13 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 28) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -13; заряженная молекула (C), состоящая из 12 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 29) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -12; заряженная молекула (C), состоящая из 11 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 30) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -11; заряженная молекула (C), состоящая из 10 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 31) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -10; заряженная молекула (C), состоящая из 9

мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 32) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -9; заряженная молекула (C), состоящая из 8 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 33) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -8; заряженная молекула (C), состоящая из 7 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 34) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -7; заряженная молекула (C), состоящая из 6 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 35) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -6; заряженная молекула (C), состоящая из 5 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 36) применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -5; заряженная молекула (C), состоящая из 4 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp-Asp (SEQ ID NO: 37), применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -4; заряженная молекула (C), состоящая из 3 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp-Asp, применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -3; заряженная молекула (C), состоящая из 2 мономеров аспарагиновой кислоты, например, Asp, применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -2; заряженная молекула (C), состоящая из 1 мономера аспарагиновой кислоты, например, Asp, применяется для получения заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом -1. В приведенных выше примерах, аспарагиновая кислота (Asp) может быть заменена любой подходящей отрицательно заряженной аминокислотой, включая, но этим не ограничиваясь, глутаминовую кислоту, сульфосерин или фосфор-серин, при этом, отрицательно заряженные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными.

[00347] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) имеет суммарный положительный заряд и состоит из положительно заряженных групп. Подходящие положительно заряженные молекулы (C) включают молекулы с функциональными группами, которые несут положительный заряд при физиологической норме pH, при pH, примерно, 7,4, например, конъюгатная кислота слабых оснований, при этом, pKa конъюгатной кислоты основания больше, примерно, 8,5. Подходящие положительно заряженные молекулы (C) включают, но этим не ограничиваются, молекулы, несущие первичные, вторичные и третичные амины, а также функциональные группы четвертичного аммония, гуанидиния, фосфония и сульфония.

Подходящие молекулы, несущие аммониевые функциональные группы, включают, например, соединения имидазолия и тетраалкиламмония. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) состоит из четвертичных аммониевых соединений, которые несут постоянный положительный заряд, который не зависит от рН.

[00348] Неограничивающие примеры положительно заряженных функциональных групп, которые имеют заряд, независимый от рН, включают:



где f = 1-6, где R = низший алкил где f = 1-6, где R = низший алкил
 при этом, X⁻ представляет собой любой подходящий противоион.

[00349] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) состоит из функциональных групп, которые встречаются в виде конъюгатной кислоты основания при физиологической норме рН, таких как, например, первичные, вторичные и третичные амины. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, положительно заряженная молекула (С) состоит из положительно заряженных функциональных групп, в количестве от 1 до 20, например, из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 положительно заряженных функциональных групп, хотя, обычно, из положительно заряженных функциональных групп в количестве не более 16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) представляет собой пептид поли(лизина) длиной от 1 до 6 аминокислот. Ожидается, что последовательность поли(лизина), состоящая из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, будет иметь положительный заряд +1, +2, +3, +4, +5 или +6, соответственно, при рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) представляет собой пептид поли(аргинина) длиной от 2 до 6 аминокислот.

[00350] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) имеет суммарный положительный заряд и состоит из, по меньшей мере, 1 положительно заряженной аминокислоты. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) с суммарным положительным зарядом состоит из от 1 до 20 положительно заряженных аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В неограничивающем примере, заряженная молекула (С) состоит из 16 лизиновых

заряженная молекула (С), состоящая из 3 лизиновых мономеров, например, Lys-Lys-Lys, применяется для получения заряженной молекулы (С) с суммарным положительным зарядом +3; заряженная молекула (С), состоящая из 2 лизиновых мономеров, например, Lys-Lys, применяется для получения заряженной молекулы (С) с суммарным положительным зарядом +2; заряженная молекула (С), состоящая из 1 лизина, например, Lys, применяется для получения заряженной молекулы (С) с суммарным положительным зарядом +1. В приведенных выше примерах, Лизин (Lys) может быть заменена любой подходящей положительно заряженной аминокислотой, включая, но этим не ограничиваясь, триметиллизин или аргинин, при этом, положительно заряженные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными.

[00351] Заряженные молекулы (С) могут дополнительно содержать малые незаряженные, гидрофильные аминокислоты или гидрофильные линкеры, например, этиленоксид, которые функционируют для i) улучшения растворимости в воде и ii) увеличения расстояния между заряженными функциональными группами для предотвращения неполной ионизации. Например, ионизация одной функциональной группы на полимере может влиять на рКа соседних функциональных групп посредством локальных эффектов. Например, протонирование амина в непосредственной близости от второго амина может снизить рКа конъюгатной кислоты второго амина. Для уменьшения влияния локальных эффектов на потенциал ионизации соседних функциональных групп, линкерную молекулу можно применять для увеличения расстояния между заряженными функциональными группами, содержащими заряженную молекулу. Линкерная молекула может содержать от 1 до 5 малых незаряженных гидрофильных аминокислот, например, 1, 2, 3, 4 и 5 аминокислот. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, линкер может содержать этиленоксидный (то есть, PEG) линкер, длиной от 1 до 4 мономерных звеньев, например, длиной 1, 2, 3 или 4 этиленоксидных мономеров. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, 1-2 малые незаряженные гидрофильные аминокислоты помещают между соседними заряженными аминокислотами, содержащими заряженную молекулу (С), при этом, аминокислоты сцеплены посредством амидных связей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, серин помещают между каждой заряженной аминокислотой, содержащей заряженную молекулу (С) с суммарным положительным зарядом. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) состоит из повторяющихся дипептидов лизина и серина, то есть, (Lys-Ser)_n, при этом, n обычно представляет собой любое целое число от 1 до 20, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В качестве других примеров, серин

помещают между каждой заряженной аминокислотой трипептидной заряженной молекулы (C) с суммарным зарядом +2, например, Lys-Ser-Lys; серин помещают между каждой заряженной аминокислотой заряженной молекулы (C) из 5 аминокислот с суммарным зарядом +3, например, Lys-Ser-Lys-Ser-Lys (SEQ ID NO: 51); серин помещают между каждой заряженной аминокислотой заряженной молекулы (C) из 7 аминокислот с суммарным зарядом +4, например, Lys-Ser-Lys-Ser-Lys-Ser-Lys (SEQ ID NO: 52). В приведенных выше примерах, Лизин (Lys) может быть заменен любой подходящей положительно заряженной аминокислотой, включая, но этим не ограничиваясь, триметиллизин или аргинин, при этом, положительно заряженные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными.

[00352] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, серин помещают между каждой заряженной аминокислотой, содержащей заряженную молекулу (C) с суммарным отрицательным зарядом. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула состоит из повторяющихся дипептидов аспарагиновой кислоты и серина, то есть, (Asp-Ser)_n, при этом, n обычно представляет собой любое целое число от 1 до 20, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В качестве других примеров, серин помещают между каждой заряженной аминокислотой трипептидной заряженной молекулы (C) с суммарным зарядом -2, например, Asp-Ser-Asp; серин помещают между каждой заряженной аминокислотой заряженной молекулы (C) из 5 аминокислот с суммарным зарядом -3, например, Asp-Ser-Asp-Ser-Asp (SEQ ID NO: 53); серин помещают между каждой заряженной аминокислотой заряженной молекулы (C) из 7 аминокислот с суммарным зарядом -4, например, Asp-Ser-Asp-Ser-Asp-Ser-Asp (SEQ ID NO: 54). В приведенных выше примерах, аспарагиновая кислота (Asp) может быть заменена любой подходящей отрицательно заряженной аминокислотой, включая, но этим не ограничиваясь, глутаминовую кислоту, сульфосерин или фосфорсерин, при этом, отрицательно заряженные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными.

[00353] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) состоит как из отрицательно, так и из положительно заряженных аминокислот. Дипептиды, состоящие из аминокислот с противоположным зарядом, например, Lys-Asp, именуют цвиттерионными дипептидами, потому что, по прогнозам, они имеют суммарный нейтральный, 0, заряд при pH 7,4. По меньшей мере, один цвиттерионный дипептид может быть включен в заряженную молекулу (C) в качестве средства для i) улучшения растворимости в воде и ii) предложения преобладающего заряда (например, суммарного отрицательного или суммарного положительного) в

определенных диапазонах рН. Например, цвиттерионный дипептид может быть применен для повышения гидрофильности пептидной последовательности без увеличения или уменьшения заряда пептидной последовательности при рН 7,4. Однако цвиттерион может быть применен для придания суммарного заряда при конкретном рН. Например, исключая вклад N-концевого амина и C-концевой карбоновой кислоты в этом примере, цвиттерионный дипептид, Lys-Asp, имеет суммарный заряд 0 при рН 7,4, но суммарный заряд +1 при рН < 4 и суммарный заряд -1 при рН > 10. По меньшей мере, один цвиттерионный дипептид может быть добавлен к последовательности заряженных молекул (С); например, один дипептид, Lys-Asp; два дипептида Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO: 55); три дипептида, Lys-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp (SEQ ID NO: 56) и так далее. В приведенных выше примерах, Лизин (Lys) может быть заменен любой подходящей положительно заряженной аминокислотой, включая, но этим не ограничиваясь, триметиллизин или аргинин, а аспарагиновая кислота (Asp) может быть заменена любой подходящей отрицательно заряженной аминокислотой, включая, но этим не ограничиваясь, глутаминовой кислотой, сульфосерином или фосфосерином, при этом, положительно или отрицательно заряженные аминокислоты могут быть одинаковыми или разными.

[00354] Композицию заряженной молекулы (С) выбирают таким образом, чтобы предложить суммарный заряд, необходимый для пептидного антигенного конъюгата для конкретного применения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, раскрытых в настоящем документе, заряженная молекула (С) представляет собой положительно заряженную поли(аминокислоту), состоящую из лизинов или аргининов, или лизинов, или аргининов, и незаряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженный фрагмент состоит из сульфониевых или четвертичных аммониевых функциональных групп, которые несут рН-независимый положительный заряд. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, раскрытых в настоящем документе, заряженная молекула (С) представляет собой отрицательно заряженную поли(аминокислоту), состоящую из глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, или глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты и незаряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженный фрагмент содержит фосфатные или сульфатные группы, такие как, сульфосерин или фосфосерин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула состоит из лизинов или аргининов и глутаминовой кислоты, или аспарагиновой кислоты, или лизинов, или аргининов, и глутаминовой кислоты, или аспарагиновой кислоты, а также незаряженных

аминокислот. Как положительные, так и отрицательно заряженные функциональные группы могут быть включены в одну и ту же заряженную молекулу (С). Заряженная молекула (С) может быть положительной, отрицательной или нейтральной, но суммарный заряд пептидного антигенного конъюгата должен быть ненулевым, например, суммарные заряды более +3 или менее -3 являются предпочтительными и зависят от конкретного применения.

[00355] Дополнительным фактором, касающимся заряженных молекул (С), на который следует обратить внимание, является выбранный противоион. Неограничивающие примеры заряженных молекул (С), несущих функциональные группы с положительным зарядом, включают, но этим не ограничиваются, галогениды, включая анионы хлоридов, бромидов и йодидов, и конъюгатные основания кислот, включая анионы фосфатов, сульфатов, сульфитов и карбоксилатов, включая формиат, сукцинат, ацетат и трифторацетат. Подходящие противоионы для заряженных молекул (С), несущих функциональные группы с отрицательным зарядом, включают, но этим не ограничиваются, водород и щелочные и щелочноземельные металлы, включая, например, натрий, калий, магний и кальций или конъюгатные кислоты слабых оснований, такие как, соединения аммония.

[00356] Заряженная молекула (С) может быть сцеплена непосредственно с пептидным антигеном (А), либо непосредственно, либо опосредованно, посредством удлинения (В1 или В2), Линкера (L), Линкера и удлинения (В1 или В2), или Частицы (Р), или гидрофобной молекулы (Н), которая сцеплена, непосредственно или опосредованно, посредством Линкера (L) и/или удлинения (В1 или В2), с пептидным антигеном.

[00357] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) сцеплена с необязательным N- или С-концевым удлинением (В1 или В2), которое сцеплено либо с N-, либо с С-концом, соответственно, пептидного антигена (А), который сцеплен либо на С-, либо на N-конце, соответственно, с необязательным удлинением (В2), которое сцеплено либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с Частицей (Р) или гидрофобной молекулой (Н) с выходом пептидного антигенного конъюгата Формулы V, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной:

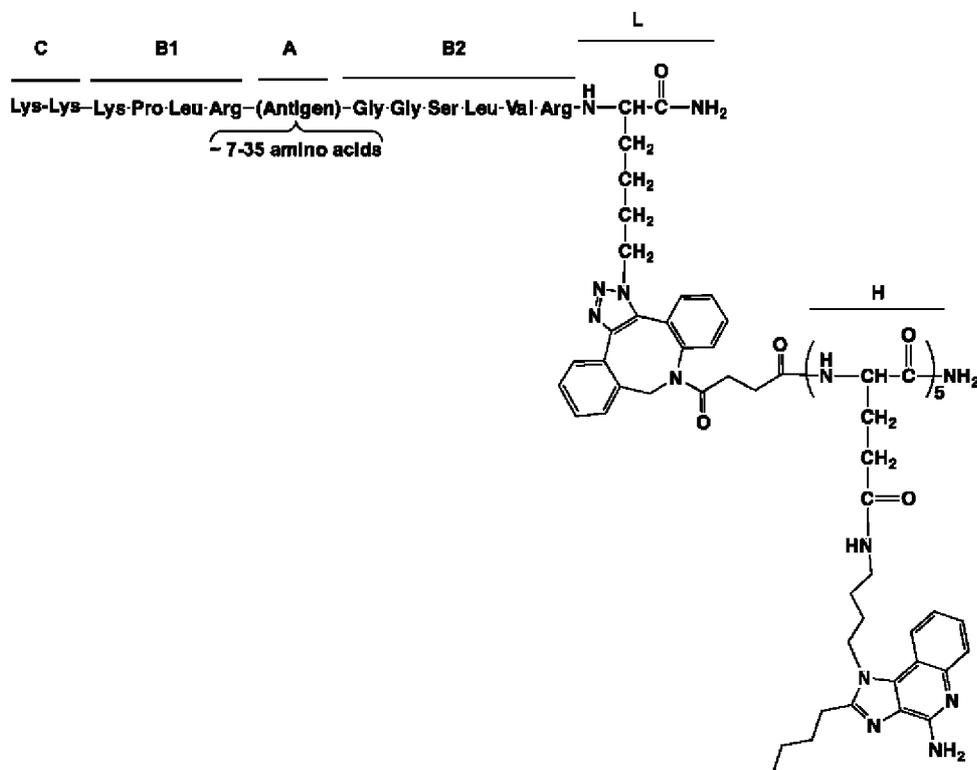
C-[B1]-A-[B2]-[L]-P, C-[B1]-A-[B2]-[L]-H, P-[L]-[B1]-A-[B2]-C, или H-[L]-[B1]-A-[B2]-C

Формула V

[00358] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) помещена на N-конце пептидного антигенного конъюгата

Формулы V, при этом, заряженная молекула (C) сцеплена с N-концевым удлинением (B1), состоящим из расщепляемого катепсином удлинения тетрапептида (B1 = PN4-PN3-PN2-PN1), которое сцеплено с N-концом пептидного антигена (A), который сцеплен на C-конце с C-концевым удлинением (B2), состоящим из комбинированного иммунопротеасомного и расщепляемого катепсином удлинения гексапептида (B2 = PC1'-PC2'-PC3'-PC4'-PC5'-PC6'), которое сцеплено с Линкером (L), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P). Пептидный антиген (A) пептидного антигенного конъюгата Формулы V состоит из целого числа аминокислот, n, при этом, n обычно составляет от 7 до 35 аминокислот, а гидрофобная молекула (H) обычно представляет собой поли(аминокислоту) Формулы I или II, сцепленную с Адьювантом Формулы III.

[00359] Неограничивающий пример пептидного антигенного конъюгата Формулы V, состоящего из заряженной молекулы (C = Lys-Lys), сцепленной с расщепляемым катепсином удлинением тетрапептида (B1 = Lys-Pro-Leu-Arg SEQ ID NO: 8) на N-конце пептидного антигена (A), который сцеплен на C-конце с расщепляемым катепсином удлинением гексапептида (B2 = Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 13), который сцеплен с триазольным Линкером (L), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей из поли(аминокислоты) Формулы I, которая сцеплена с Адьювантом Формулы I, предложен в настоящем документе:

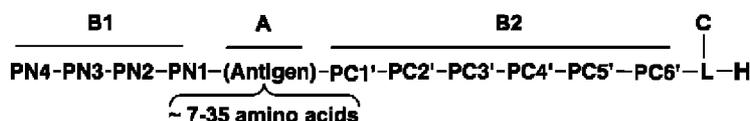


[00360] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С; или С1 и С2, когда присутствуют две заряженные молекулы) может быть сцеплена непосредственно с гидрофобной молекулой (Н) или с Линкером (L), который сцеплен с С-концевым удлинением (В2), которое сцеплено с С-концом пептидного антигена (А), которое необязательно сцеплено на N-конце с N-концевым удлинением (В1), которое необязательно сцеплено с дополнительным необязательным заряженным фрагментом (С1); или заряженная молекула (С; или С1 и С2, когда присутствуют две заряженные молекулы) может быть сцеплена непосредственно с гидрофобной молекулой (Н) или с Линкером (L), который сцеплен с N-концевым удлинением (В1), которое сцеплено с N-концом пептидного антигена (А), который необязательно сцеплен на С-конце с С-концевым удлинением (В2), которое необязательно сцеплено с дополнительным необязательным заряженным фрагментом (С2) с выходом пептидного антигенного конъюгата Формулы VI, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной:

[B1]-A-[B2]-L(C)-H, [B1]-A-[B2]-L-H(C), [C1]-[B1]-A-[B2]-L(C2)-H, [C1]-[B1]-A-[B2]-L-H(C2), H-L(C)-[B1]-A-[B2], H(C)-[B1]-A-[B2], H-L(C1)-[B1]-A-[B2]-C2 или H(C1)-[B1]-A-[B2]-C2

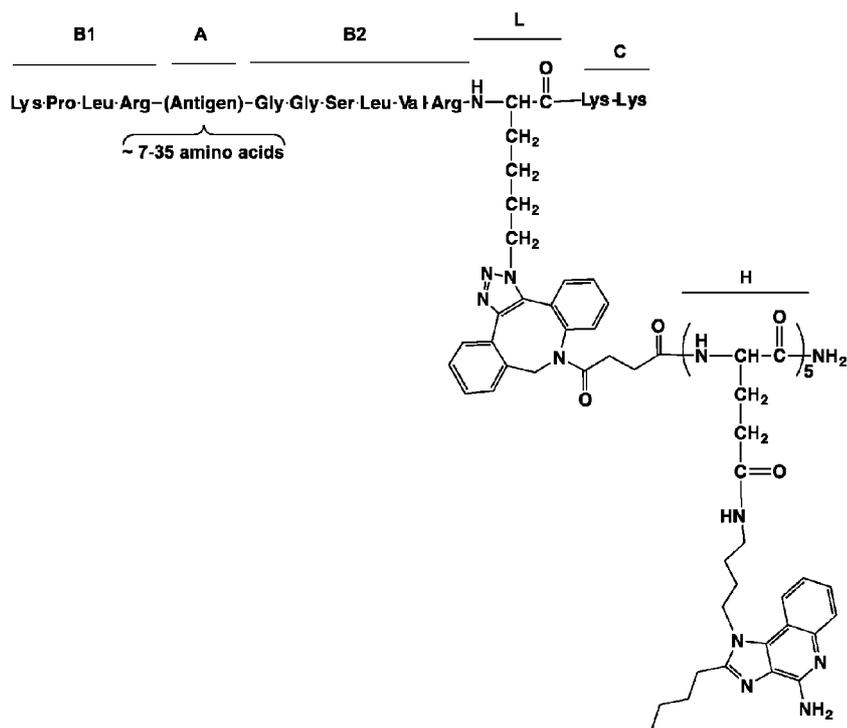
Формула IV

[00361] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (С) помещена на С-конце пептидного антигенного конъюгата Формулы VI, при этом, заряженная молекула (С) сцеплена с Линкером (L), который необязательно сцеплен с С-концевым удлинением (В2), состоящим из иммуно-протеасомного, катепсинового или комбинированного иммуно-протеасомного и расщепляемого катепсином удлинения, обычно длиной от 1 до 6 аминокислот (В2 = PC1', PC1'-PC2', PC1'-PC2'-PC3', PC1'-PC2'-PC3'-PC4', PC1'-PC2'-PC3'-PC4'-PC5' или PC1'-PC2'-PC3'-PC4'-PC5'-PC6'), которое сцеплено с С-концом пептидного антигена (А), который необязательно сцеплен на N-конце с расщепляемым катепсином удлинением, обычно длиной от 1 до 4 аминокислот (В1 = PN1, PN2-PN1, PN3-PN2-PN1 или PN4-PN3-PN2-PN1), при этом, Линкер (L) дополнительно сцеплен с гидрофобной молекулой (H), как показано ниже:



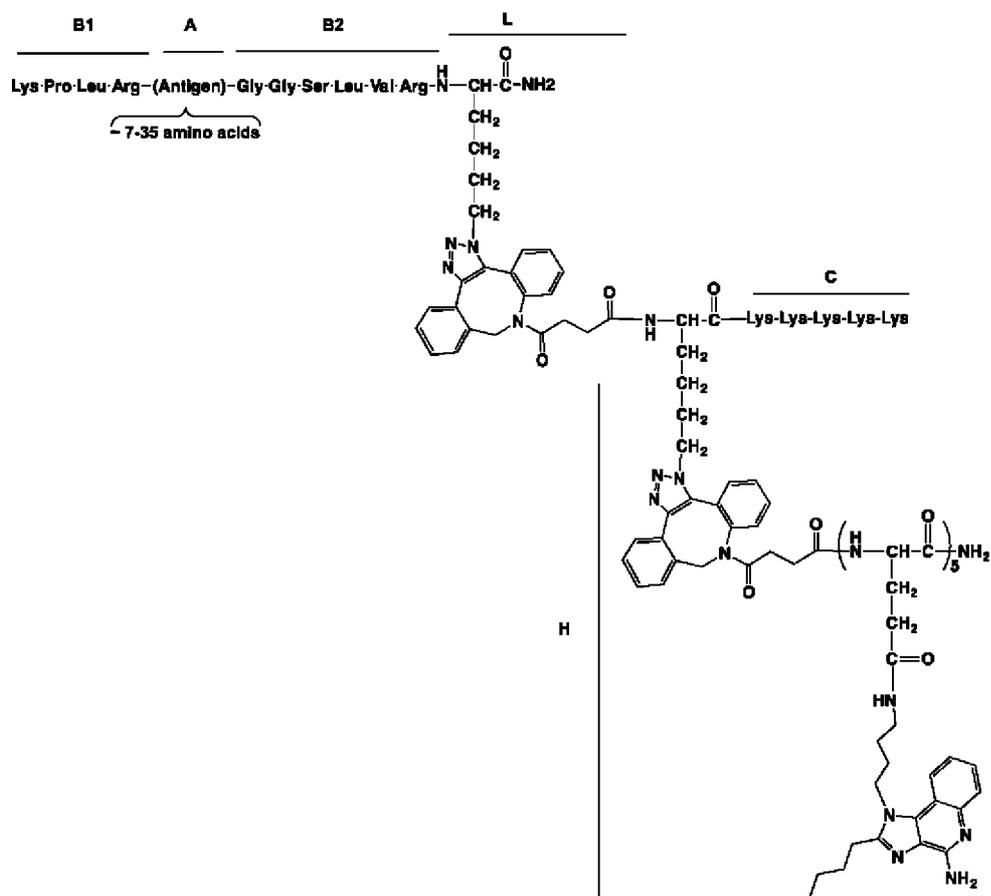
[00362] Пептидный антиген (A) пептидного антигенного конъюгата Формулы VI состоит из целого числа аминокислот, n, при этом, n обычно составляет от 7 до 35 аминокислот или до 50 аминокислот, а гидрофобная молекула обычно представляет собой поли(аминокислоту) Формулы I или II, сцепленную с Адьювантом Формулы III.

[00363] Предложен неограничивающий пример пептидного антигенного конъюгата Формулы VI, состоящего из заряженной молекулы (например, C = Lys-Lys), сцепленной посредством амидной связи с С-концом Линкера (L), который сцеплен с комбинированным иммуно-протеасомным и расщепляемым катепсином С-концевым удлинением гексапептида (например, B2 = Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 13), которое сцеплено с С-концом пептидного антигена (A) который сцеплен на N-конце с расщепляемым катепсином N-концевым удлинением тетрапептида (например, B1 = Lys-Pro-Leu-Arg SEQ ID NO: 8), при этом, Линкер (L) дополнительно сцеплен с гидрофобной молекулой (H), которая состоит из поли(аминокислоты) Формулы I, которая сцеплена с Адьювантом Формулы III:



[00364] Дополнительным неограничивающим примером пептидного антигенного конъюгата Формулы VI, B1-A-B2-L-H(C), является заряженный фрагмент (C = Lys-Lys-Lys-Lys-Lys SEQ ID NO: 49), сцепленный посредством линкера с гидрофобной молекулой (H), которая состоит из поли(аминокислоты) Формулы I, которая сцеплена с Адьювантом Формулы III, который сцеплен с Линкером (L), который сцеплен с комбинированным иммуно-протеасомным и расщепляемым катепсином С-концевым удлинением гексапептида (B2 = Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 13), которое сцеплено с С-

концом пептидного антигена (A), а N-конец пептидного антигена (A) сцеплен с расщепляемым катепсином N-концевым удлинением тетрапептида (B1 = Lys-Pro-Leu-Arg SEQ ID NO: 8):



[00365] В дополнительном неограничивающем примере пептидного антигенного конъюгата Формулы VI, B1-(A)₇₋₃₅-B2-L(-C)-H, пептидный антиген (A) с последовательностью Ala-Lys-Phe-Val-Ala-Ala-Trp-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO: 22) сцеплен с N-концевым удлинением (B1) с последовательностью Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7) и с C-концевым удлинением (B2) с последовательностью Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), которое сцеплено с предшественником линкера X1, например, Lys(N3), который сцеплен как с заряженным фрагментом (C), состоящим из дипептида с последовательностью Glu-Lys, так и с предшественником линкера X2, содержащим молекулу DBCO, которая сцеплена с гидрофобной молекулой (H), например: Ser-Leu-Val-Arg-Ala-Lys-Phe-Val-Ala-Ala-Trp-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-Ala-Ser-Leu-Val-Arg-Lys(N3-DBCO-H)-Glu-Lys, при этом, последовательность Glu-Lys сцеплена с C-концом Линкера (L) (Lys(N3-DBCO)), в результате чего получается пептидный антигенный конъюгат с прогнозируемым суммарным зарядом +4 при pH 7,4. В данном случае, считается, что

гидрофобная молекула (Н) вносит незначительным вклад в заряд пептидного антигенного конъюгата. Следует отметить, что можно выбрать композицию заряженного фрагмента (С) и последовательностей удлинений (В1 и В2) для предложения конкретного количества заряженных остатков, которые предлагают требуемый суммарный заряд и гидропатию пептидной последовательности, содержащей пептидный антигенный конъюгат, как описано более подробно ниже. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, количество заряженных функциональных групп, содержащих заряженный фрагмент (С), модулируется таким образом, что суммарный заряд пептидного антигенного конъюгата, содержащего заряженный фрагмент (С), пептидный антиген (А), необязательные удлинения (В1 и/или В2), Линкер (L) и гидрофобную молекулу (Н), находятся в диапазоне от -3 до -10 или от +3 до +10.

[00366] Пептидные антигенные конъюгаты Формулы VI, при этом, заряженный фрагмент (С) сцеплен с гидрофобной молекулой (Н), могут быть полезны для быстрого продуцирования индивидуализированных методов терапии, таких как, индивидуализированные противораковые вакцины. Гидрофобная молекула (Н), которая сцеплена с заряженной молекулой (С) и предшественником линкера X2 (например, X2, содержащим циклооктин), может быть получена в виде ангро, а затем легко объединена с любым пептидным антигеном (А), несущим предшественник линкера X1 (например, X1, содержащий азид) с образованием пептидного антигенного конъюгата Формулы VI, [C1]-[B1]-A-[B2]-L-N(C2), или N(C)-L-[B1]-A-[B2]-[C2], при этом, [] обозначает, что группа является необязательной.

[00367] Функция заряженного фрагмента (С) заключается в стабилизации наночастиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, в водных условиях. В то время как гидрофобная молекула (Н) индуцирует образование частиц пептидных антигенных конъюгатов, необязательная заряженная молекула (С) предлагает противодействующую силу, которая предотвращает флоккуляцию и, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заставляет пептидные антигенные конъюгаты собираться в мицеллы наночастиц с поверхностным зарядом, предложенным заряженным фрагментом (С).

[00368] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат не содержит заряженных молекул, таких как [B1]-A-[B2]-[L]-N, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной. Неограничивающие примеры включают А-Н, А-Л-Н, А-В2-Н, А-В2-Л-Н, В1-А-В2-Л-Н. Пептидные антигенные конъюгаты, которые не содержат заряженную молекулу (С), могут подвергаться агрегации в водных условиях. Для улучшения стабильности частиц,

образованных пептидными антигенными конъюгатами, которые не содержат заряженный фрагмент (С), можно добавить заряженную или амфифильную молекулу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, первый пептидный антигенный конъюгат, который не содержит заряженный фрагмент (С) (то есть, [В1]-А-[В2]-[L]-Н), смешивают со вторым пептидным антигенным конъюгатом, содержащим заряженный фрагмент (например, С-[В1]-А-[В2]-[L]-Н) в растворе ДМСО и затем ресуспендируют в водных условиях с образованием стабильных наночастиц. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат, который не содержит заряженную молекулу (С) (то есть, [В1]-А-[В2]-[L]-Н), смешивают с гидрофобной молекулой (Н), сцепленной с заряженной молекулой (С), такой как, С-Н, в растворе ДМСО и затем ресуспендируют в водных условиях с образованием стабильных наночастиц.

[00369] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат, который не содержит заряженную молекулу (С), такой как, [В1]-А-[В2]-[L]-Н, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной, объединен с амфифильным носителем, С-[В1]-[А']-[В2]-[L]-Н, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной, а необязательный А' представляет собой консервативный антиген (то есть, не предназначенный для конкретного пациента). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат, содержащий заряженную молекулу (С), объединен с амфифильным носителем. Амфифильный носитель служит для стабилизации наночастиц, таких как, мицеллы наночастиц, образованные пептидными антигенными конъюгатами.

Выбор заряженной молекулы и удлинений (В1 и В2)

[00370] Композиция необязательных удлинений, В1 и В2, сцепленных на N- и C-конце пептидного антигена (А), соответственно, вместе с необязательной заряженной молекулой(ами) (С), должна быть выбрана для: I) достижения соответствующего суммарного заряда и баланса гидрофильных и гидрофобных характеристик, которые необходимы для стабилизации частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, в водных буферных растворах при физиологической температуре и рН, примерно, 7,4; и II) обеспечения того факта, что пептидные антигены (А), доставляемые в контексте пептидного антигенного конъюгата, могут быть обработаны для высвобождения минимальных CD4 и/или CD8 Т-клеточных эпитопов, предложенных на пептидном антигене (А), в результате чего эпитопы могут быть презентированы в контексте молекул МНС класса I и класса II. Следующее описание раскрывает специфические композиции удлинений В1 и В2 с заряженными молекулами (С), которые

приводят к неожиданным улучшениям контроля над размером и стабильностью частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, и/или к улучшениям процессинга и презентации CD4 и/или CD8 Т-клеточных эпитопов, предложенных в виде пептидных антигенов (А) на тех частицах, которые приводят к значительному усилению Т-клеточных ответов.

[00371] Неожиданное открытие, раскрытое в настоящем документе, заключается в том, что пептидные антигены (А), содержащие минимальные CD8 Т-клеточные эпитопы, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов, например, пептидных антигенных конъюгатов Формул IV, V и VI, наиболее эффективно процессируются *in vitro* и приводят к более высокому уровню CD8 Т-клеточных ответов *in vivo*, когда разлагаемое ферментами С-концевое удлинение (В2) применяется на С-конце между пептидным антигеном (А) и гидрофобной молекулой (Н), и/или когда разлагаемое ферментами N-концевое удлинение (В1) применяется между N-концом пептидного антигена (А) и заряженной молекулой (С). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, включающих удлинение В1, содержащее расщепляемый катепсином сайт между заряженной молекулой (С) и пептидным антигеном (А) (например, С-В1-А-[В2]-[L]-Н, при этом, [] обозначает, что эта группа является необязательной), это привело к более эффективному процессингу минимального Т-клеточного эпитопа из пептидного антигенного конъюгата, который был ассоциирован с более высокой интенсивностью Т-клеточного ответа *in vivo*. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, в Формулах V и VI должны применяться расщепляемые катепсином последовательности в виде N-концевых (В1) и С-концевых (В2) удлинений для того, чтобы допустить эффективный процессинг и презентацию пептидных антигенов (А), предложенных в виде частиц, содержащих пептидные антигенные конъюгаты.

[00372] Дополнительное неожиданное открытие относится к идентификации суммарного заряда, необходимого для стабилизации частиц, образованных некоторыми вариантами осуществления пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению. Высокогидрофобные пептидные антигены (А), доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов, имеют склонность к агрегации в водных условиях. Чтобы противостоять этой тенденции, заряженные молекулы (С) и определенные удлинения (В1 или В2) могут быть выбраны для присоединения к пептидным антигенным конъюгатам, например, см. Формулы V и VI, или конъюгат, содержащий заряженную молекулу (например, С-[А']-[L]-Н, при этом, А' представляет собой консервативный антиген, а [] обозначает, что группа является необязательной), может быть добавлен к частицам, содержащим пептидные антигенные конъюгаты. Неожиданное открытие,

раскрытое в настоящем документе, заключается в том, что величина заряда (то есть, суммарный заряд), необходимая для стабилизации частиц, образованных посредством некоторых вариантов пептидных антигенных конъюгатов, например, пептидных антигенных конъюгатов Формул V и VI, содержащих гидрофобную молекулу (H) на основе поли(аминокислоты), зависит от гидропатии (то есть, от гидрофобных свойств) фрагмента пептидного антигена, который содержит пептидный антиген (A), необязательные заряженные молекулы (C) и необязательные удлинения (B1 и B2). Мы сообщаем о неожиданном открытии, состоящим в том, что суммарный заряд, полезный для стабилизации частиц, образованных определенными вариантами осуществления пептидных антигенных конъюгатов, может быть определен на основе гидропатии пептидного антигена (A) или фрагмента пептидного антигена. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, суммарный заряд пептидного антигенного конъюгата выбирают на основе рассчитанной гидропатии пептидного антигена (A) и модулируют заряженной молекулой (C) и необязательными удлинениями (B1 и/или B2). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, суммарный заряд пептидного антигенного конъюгата выбирают на основе рассчитанной гидропатии фрагмента пептидного антигена и модулируют заряженной молекулой (C). Для ясности, предшественники линкера (X1 и X2), Линкер (L) и гидрофобная молекула (H) или Частица (P) не учитываются при определении значения гидропатии для пептидных антигенов (A) или фрагментов пептидных антигенов, применяемых для выбора суммарного заряда пептидных антигенных конъюгатов. Таким образом, гидропатия пептидного антигенного конъюгата эквивалентна гидропатии фрагмента пептидного антигена.

Гидропатия пептидного антигена (A) или фрагмента пептидного антигена, включая пептидный антиген (A), необязательную заряженную молекулу (C) и необязательные удлинения (B1 и/или B2), может быть рассчитана с применением любого из множества способов, доступных для определения гидрофобных / гидрофильных характеристик пептида. В качестве неограничивающего примера, способ определения гидропатии пептидных антигенов (A) или фрагмента пептидного антигена заключается в расчете общего среднего значения гидропатии (GRAVY) с применением способа Кайта и Дулиттла, как описано ниже. Следующие значения Гидропатии с оценками, предложенными для неприродных аминокислот (то есть, для цитруллина, сульфосерина, фосфосерина и триметиллизина), основаны на способе Кайта и Дулиттла, и применяются для расчета значений GRAVY в настоящем документе:

Аминокислота	Код	Значения	Заряд
		Гидропатии	
Изолейцин (Ile)	I	4,5	0
Валин (Val)	V	4,2	0
Лейцин (Leu)	L	3,8	0
Фенилаланин (Phe)	F	2,8	0
Цистеин (Cys)	C	2,5	0
Метионин (Met)	M	1,9	0
Аланин (Ala)	A	1,8	0
Глицин (Gly)	G	-0,4	0
Треонин (Thr)	T	-0,7	0
Триптофан (Trp)	W	-0,9	0
Серин (Ser)	S	-0,8	0
Тирозин (Tyr)	Y	-1,3	0
Пролин (Pro)	P	-1,6	0
Гистидин (His)	H	-3,2	0,1
Глутаминовая кислота (Glu)	E	-3,5	-1
Глютамин (Gln)	Q	-3,5	0
Аспарагиновая кислота (Asp)	D	-3,5	-1
Аспарагин (Asn)	N	-3,5	0
Лизин (Lys)	K	-3,9	1
Цитруллин (Cit)	Z	-4	0
Аргинин (Arg)	R	-4,5	1
Триметиллизин	K(M e)3	-4,5	1
Фосфосерин	S- Фосфо	-4,5	-1
Сульфосерин	S- Сульфо	-4,5	-1

[00373] Процесс определения значения GRAVY пептида заключается в том, что суммируют значения Гидропатии каждой отдельной аминокислоты, содержащей пептид, и затем делят на общую длину пептида. Например, пептидный антиген из 9 аминокислот

(A) с последовательностью Val-Val-Ile-Ala-Ile-Phe-Ile-Ile-Leu (SEQ ID NO: 57) имеет значение GRAVY 3,86 (например, $(4,2 + 4,2 + 4,5 + 1,8 + 4,5 + 2,8 + 4,5 + 4,5 + 3,8)/9$ аминокислот). В качестве неограничивающего примера, тот же пептидный антиген (A), то есть, Val-Val-Ile-Ala-Ile-Phe-Ile-Ile-Leu (SEQ ID NO: 57), полученный в виде фрагмента пептидного антигена посредством твердофазного пептидного синтеза, при этом, заряженная молекула (C = Lys-Ser-Lys-Gly-Gly SEQ ID NO: 58) сцеплена с N-концевым удлинением (B1 = Lys-Pro-Leu-Arg SEQ ID NO: 8) на N-конце пептидного антигена и с C-концевым удлинением (B2 = Gly-Gly-Lys-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 11) на C-конце, который сцеплен с предшественником линкера X1 (при этом, X1 представляет собой Lys(N₃)-NH₂): Ac-Lys-Ser-Lys-Gly-Gly-Lys-Pro-Leu-Arg-Val-Val-Ile-Ala-Ile-Phe-Ile-Ile-Leu-Gly-Gly-Lys-Leu-Val-Arg-Lys(N₃)-NH₂ имеет значение GRAVY 0,75 и суммарный заряд +6.

[00374] Определение значения GRAVY фрагмента пептидного антигена или пептида (A) предлагает описание гидрофобных / гидрофильных характеристик пептидной последовательности. Как правило, значения GRAVY меньше нуля обычно указывают на то, что пептид состоит преимущественно из гидрофильных аминокислот, тогда как значения GRAVY больше нуля указывают на то, что пептид состоит преимущественно из гидрофобных аминокислотных остатков. В настоящем документе сообщается о неожиданном открытии, заключающемся в том, что по мере увеличения значения GRAVY пептидного антигена (A) или фрагмента пептидного антигена, интенсивность суммарного заряда (либо положительного, либо отрицательного), необходимого для стабилизации частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, содержащими пептидный антиген (A) (или фрагмент пептидного антигена) также увеличивается. Таким образом, пептидные антигены (A) или фрагменты пептидных антигенов с более высокими значениями GRAVY обычно требуют более высокого суммарного заряда для обеспечения стабильности частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами.

[00375] Значение GRAVY пептидного антигена (A) или фрагмента пептидного антигена, которое рассчитывают на основе аминокислотной композиции пептидного антигена (A) необязательной заряженной молекулы (C) и/или необязательных удлинений (B1 и/или B2) (и исключается вклад любых аминокислот, которые могут содержать предшественников линкера (X1 и X2), Линкер (L) и гидрофобную молекулу (H) или Частицу (P)), может быть рассчитано для определения суммарного заряда, необходимого для обеспечения образования стабильных частиц посредством некоторых вариантов осуществления пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению. Примечание: GRAVY пептидного антигенного конъюгата считается эквивалентным

GRAVY фрагмента пептидного антигена; таким образом, значение GRAVY фрагмента пептидного антигена может также относиться к значению GRAVY пептидного антигенного конъюгата.

[00376] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, значение GRAVY пептидного антигена (A) применяют для определения суммарного заряда, необходимого для стабилизации частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами. В качестве неограничивающего примера, пептидный антигенный конъюгат должен иметь суммарный заряд \geq (больше или равно) +6 или \leq (меньше или равно) -6, когда значение GRAVY для пептидного антигена (A) больше 0,75; суммарный заряд должен составлять \geq (больше или равно) +5 или \leq (меньше или равно) -5, когда значение GRAVY находится в диапазоне 0,25-0,75; суммарный заряд должен составлять \geq (больше или равно) +4 или \leq (меньше или равно) -4, когда значение GRAVY меньше 0,25. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, суммарный заряд больше или равен +4 или меньше или равен -4, в зависимости от того, какой суммарный заряд необходим: положительный или отрицательный, соответственно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (A) со значением GRAVY менее 0,25 синтезируют в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным положительным зарядом от, примерно, +4 до +15, например, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14 или +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +4 до +12; или с суммарным отрицательным зарядом от, примерно, -4 до -15, например, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 или -15, однако, обычно он составляет от, примерно, -4 до -12. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (A) со значением GRAVY в диапазоне 0,25-0,75 синтезируют в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным положительным зарядом от, примерно, +5 до +15, например, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +5 до +12; или с суммарным отрицательным зарядом от, примерно, -5 до -15, например, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 или -15, однако, обычно он составляет от, примерно, -5 до -15. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (A) со значением GRAVY больше 0,75 синтезируют в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным положительным зарядом от, примерно, +6 до +15, например, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +6 до +12; или с суммарным отрицательным зарядом от, примерно, -6 до -15, например, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 или -15, однако, обычно он составляет от, примерно, -6 до -12.

[00377] В одном варианте осуществления способа выбора заряженной молекулы (C) и необязательных удлинений (B1 и/или B2) по настоящему изобретению, для

продуцирования пептидного антигенного конъюгата с желаемым суммарным зарядом, способ может содержать этапы (i) определения GRAVY и заряда пептидного антигена (A); и (ii) выбор заряженной молекулы (C) и необязательных удлинений (B1 и/или B2) для достижения достаточного количества заряженных функциональных групп для достижения желаемого суммарного заряда. В неограничивающем примере, суммарный заряд, необходимый для пептидного антигенного конъюгата, может варьироваться в зависимости от гидропатии пептидного антигена (A) в соответствии со следующими критериями: заряд, который больше или равен +6, необходим для пептидных антигенов (A) из 25-35 аминокислот со значением GRAVY больше 0,75; заряд, который больше или равен +5, необходим для пептидных антигенов (A) из 25-35 аминокислот со значением GRAVY от 0,25 до 0,75; и заряд, который больше или равен +4, необходим для пептидных антигенов (A) из 25-35 аминокислот со значением GRAVY менее 0,25. Таким образом, в этом неограничивающем примере, пептидный антиген из 25 аминокислот (A) со значением GRAVY 2,0 и зарядом +2 должен быть объединен с заряженной молекулой (C) и необязательными удлинениями (B1 и/или B2), содержащими суммарный заряд, по меньшей мере, +4 для достижения суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата +6. В дополнительном неограничивающем примере, суммарный заряд, необходимый для пептидного антигенного конъюгата, может варьироваться, в зависимости от гидропатии пептидного антигена (A) в соответствии со следующими критериями: заряд, который меньше или равен -6, необходим для пептидных антигенов (A) из 25-35 аминокислот со значением GRAVY более 0,75; заряд, который меньше или равен -5, необходим для пептидных антигенов (A) из 25-35 аминокислот со значением GRAVY от 0,25 до 0,75; и заряд, который меньше или равен -4, необходим для пептидных антигенов (A) из 25-35 аминокислот со значением GRAVY менее 0,25. Таким образом, в этом неограничивающем примере, пептидный антиген (A) со значением GRAVY 2,0 и зарядом +2 должен быть объединен с заряженной молекулой (C) и необязательными удлинениями (B1 и/или B2), содержащими суммарный заряд -8 для достижения суммарного заряда конъюгата пептидного антигена -6.

[00378] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, определение значения GRAVY для фрагмента пептидного антигена, включая необязательную заряженную молекулу (C), необязательные удлинения (B1 и/или B2) и пептидный антиген (A), применяют для определения суммарного заряда, необходимого для стабилизации частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами. В качестве неограничивающего примера, пептидный антигенный конъюгат должен иметь суммарный заряд \geq (больше или равно) +6 или \leq (меньше или равно) -6, когда значение

GRAVY фрагмента пептидного антигена больше 0,75; суммарный заряд должен составлять \geq (больше или равно) +5 или \leq (меньше или равно) -5, когда значение GRAVY находится в диапазоне 0,25–0,75; суммарный заряд должен составлять \geq (больше или равно) +4 или \leq (меньше или равно) -4, когда значение GRAVY меньше 0,25. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, суммарный заряд больше или равен +4 или меньше или равен -4, в зависимости от того, какой суммарный заряд необходим: положительный или отрицательный, соответственно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фрагменты пептидных антигенов со значением GRAVY менее 0,25 имеют суммарный положительный заряд от, примерно, +4 до +15, например, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14 или +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +4 до +12; или суммарный отрицательный заряд от, примерно, -4 до -15, например, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 или -15, однако, обычно он составляет от, примерно, -4 до -12. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фрагменты пептидного антигена со значением GRAVY в диапазоне 0,25-0,75 имеют суммарный положительный заряд от, примерно, +5 до +15, например, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +5 до +12; или суммарный отрицательный заряд от, примерно, -5 до -15, например, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 или -15, однако, обычно он составляет от, примерно, -5 до -12. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фрагменты пептидного антигена со значением GRAVY больше 0,75, имеют суммарный положительный заряд от, примерно, +6 до +15, например, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +6 до +15, например, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, однако, обычно он составляет от, примерно, +6 до -15, например, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 или -15, однако, обычно он составляет от, примерно, -6 до -12.

[00379] Дополнительным неожиданным открытием является тот факт, что интенсивность суммарного заряда, необходимого для стабилизации частиц, образованных посредством определенных вариантов осуществления пептидных антигенных конъюгатов, например, пептидных антигенных конъюгатов Формулы V и Формулы VI, обычно увеличивается с длиной пептидного антигена (A). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (A) из 7-14 аминокислот синтезируют в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным зарядом, который больше или равен +6 или меньше или равен -6; пептидные антигены (A) из 15-24 аминокислот синтезируют в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным зарядом, который больше или равен +7 или меньше или равен -7; и пептидные антигены (A) из 25-35 аминокислот синтезируют в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным зарядом, который больше или равен +8 или меньше или равен -8.

[00380] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции содержат частицы, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов формулы [B1]-A-[B2]-[L]-H и конъюгатов заряженной молекулы (C) формулы C-[A']-[L]-H, при этом, [] обозначает, что группа является необязательной, а A' представляет собой необязательный консервативный антиген (то есть, не специфичный для пациента), кроме того, при этом, молярное соотношение [B1]-A-[B2]-[L]-H – C-[A']-[L]-H выбрано из диапазона от 1:20 до 20: 1, такого как, 1:20, 1: 10, 1:5, 1:2, 1:1, 2: 1, 5: 1, 10: 1 и 20: 1, а суммарный заряд формулы C-[A']-[L]-H является отрицательным и выбран в диапазоне от -2 до -20, таким как, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19 или -20, обычно от, примерно, -4 до -12 или положительным и выбран в диапазоне от +2 до +20, например, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +15, +16, +17, +18, +19 или +20, обычно от +4 до +12. В неограничивающем примере, иммуногенная композиция содержит частицы, содержащие 1 молярный эквивалент пептидного антигенного конъюгата, Ala-Ser-Met-Thr-Asn-Met-Glu-Leu-Met-Ser-Ser-Lys(N3-DBCO-H)-NH₂, который несет суммарный заряд 0 (следует учесть, что фрагмент пептида имеет C-концевой амид) и 1 молярный эквивалент конъюгата заряженной молекулы (C), состоящего из (Lys)₅-Lys(N3-DBCO-NH)-NH₂, который несет суммарный заряд +6; соотношение пептидного антигенного конъюгата к конъюгату заряженной молекулы составляет 1: 1, а суммарный заряд каждого набора из этих двух молекул составляет +6. Таким образом, суммарный заряд частиц можно регулировать, модулируя соотношение пептидного антигенного конъюгата к конъюгату заряженной молекулы (C), или модулируя суммарный заряд конъюгата заряженной молекулы. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, соотношение пептидного антигенного конъюгата к заряженной молекуле составляет от, примерно, 1:4 до 4: 1, и суммарный заряд заряженной молекулы выбирают таким образом, чтобы средний суммарный заряд молекул, содержащих частицы, составлял от, примерно, +4 до, примерно, +12 или от, примерно, -4 до, примерно, -12. Например, частица, содержащая молярное соотношение пептидных антигенных конъюгатов 1: 1 к конъюгатам заряженной молекулы (C), при этом, пептидный антигенный конъюгат имеет суммарный заряд 0, средний суммарный заряд молекул составляет +4, когда суммарный заряд конъюгата заряженной молекулы (C) составляет +8.

[00381] Для определенных применений, могут быть полезны положительно заряженные пептидные антигенные конъюгаты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат может содержать пептидный антиген (A), заряженную молекулу (C), содержащую положительно заряженные

функциональные группы, гидрофобную молекулу (H) или Частицы (P), необязательные удлинения (B1 и/или B2) и необязательный Линкер (L). Композицию заряженных молекул (C) и необязательные удлинения (B1 и/или B2) выбирают для осуществления максимальной стабильности частиц и биологической активности пептидных антигенных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат Формулы V, состоящий из заряженной молекулы (C) с суммарным положительным зарядом, сцеплен с N-концевым пептидным удлинением (B1), которое сцеплено с пептидным антигеном (A), который сцеплен с C-концевым пептидным удлинением (B2), которое сцеплено, либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (H), и полученный в результате пептидный антигенный конъюгат имеет суммарный положительный заряд. В этом примере, гидрофобная молекула (H), сцепленная посредством C-конца пептидного антигена (A), функционирует для индукции образования частиц, а заряженная молекула (C), сцепленная посредством N-конца пептидного антигена (A), функционирует для стабилизации частиц посредством высокой плотности положительного заряда на поверхности этих частиц. Таким образом, необязательные удлинения B2, помещенные проксимально к гидрофобной молекуле (H) пептидных антигенных конъюгатов с суммарным положительным зарядом из Формулы V, при этом, заряженная молекула (C) сцеплена посредством N-конца пептидного антигена (A), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, состоят из незаряженных и гидрофобных аминокислот, которые помогают стимулировать образование частиц, и их обычно выбирают из одиночных аминокислот, таких как, глицин, серин, цитруллин, лейцин, норлейцин или метионин; дипептидов, таких как, Gly-Cit, Gly-Ser или Gly-Leu; трипептидов, таких как, Gly-Ser-Cit, Gly-Pro-Cit или Gly-Pro-Gly; тетрапептидов, таких как, Ser-Pro-Val-Cit или Gly-Pro-Gly-Cit; пентапептидов, таких как, Gly-Ser-Val-Leu-Cit, Gly-Pro-Val-Leu-Cit; или гексапептидов, таких как, Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Cit или Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, применяется C-концевое удлинение (B2), которое включает одиночную заряженную аминокислоту, и его обычно выбирают из одиночной аминокислоты, такой как, аргинин или лизин; из дипептидов, таких как, Gly-Arg или Gly-Lys; трипептидов, таких как, Gly-Ser-Arg или Gly-Ser-Lys; тетрапептидов, таких как Gly-Pro-Gly-Arg (SEQ ID NO: 59), Gly-Ser-Val-Arg (SEQ ID NO: 60), или Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7) (где Arg можно заменить на Lys); пентапептидов, таких как, Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 17) (где Arg может быть заменен на Lys); и гексапептидов, таких как, Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 13) или Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 61) (где Arg может быть заменен на Lys). Удлинения B1, помещенные проксимально к заряженной молекуле (C)

положительно заряженных пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, при этом, заряженная молекула (C) сцеплена посредством N-конца пептидного антигена (A), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, содержат заряженную аминокислоту, такую как, Arg или Lys, и их обычно выбирают из одиночных аминокислот, выбранных из Arg или Lys; дипептидов, выбранных из Val-Arg или Leu-Arg (где Arg может быть заменен на Lys); трипептидов, выбранных из Pro-Val-Arg или Gly-Val-Arg (где Arg может быть заменен на Lys); или тетрапептидов, выбранных из Lys-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 62), Lys-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 9), Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 8), Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7) и Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 6) (где Arg можно заменить на Lys). Различные удлинения, B1 и B2, могут быть объединены с любой заряженной молекулой (C), пептидным антигеном (A), гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P) и Линкером (L) для достижения Общего среднего значения гидропатии (GRAVY) и суммарного заряд пептидного антигенного конъюгата, необходимого для предполагаемого применения.

[00382] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат с суммарным положительным зарядом из Формулы V содержит заряженную молекулу (C), обычно содержащую от 4 до 12 положительно заряженных функциональных групп, например, (Lys)₄₋₁₂, которая сцеплена с N-концевым удлинением (B1) дипептида, например, Val-Arg, которое сцеплено с пептидным антигеном (A), который обычно содержит от 7 до 35 аминокислот, который сцеплен с C-концевым удлинением (B2), например, Ser-Pro-Val-Cit, то есть, сцеплен с Линкером (Lys(N3)-DBCO), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей из поли(аминокислот) Формулы I или Формулы II, сцепленной с адъювантами Формулы III.

[00383] Для определенных применений, требуются отрицательно заряженные пептидные антигенные конъюгаты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат может содержать пептидный антиген (A), заряженную молекулу (C), содержащую положительно заряженные функциональные группы, гидрофобную молекулу (H) или Частицы (P), необязательные удлинения (B1 и/или B2) и необязательный Линкер (L). Композиция заряженных молекул (C) и необязательные удлинения (B1 и/или B2) выбирают для осуществления максимальной стабильности частиц и биологической активности пептидных антигенных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат Формулы V, состоящий из заряженной молекулы (C) с суммарным отрицательным зарядом, сцеплен с N-концевым пептидным удлинением (B1), которое сцеплено с пептидным антигеном (A), который сцеплен с C-концевым пептидным

удлинением (B2), которое сцеплено, либо непосредственно, либо посредством Линкера (L), с гидрофобной молекулой (H), и полученный в результате пептидный антигенный конъюгат имеет суммарный отрицательный заряд. Таким образом, удлинение B2, помещенное проксимально к гидрофобной молекуле (H) пептидных антигенных конъюгатов с суммарным отрицательным зарядом из Формулы V, при этом, заряженная молекула (C) сцеплена посредством удлинения B1 на N-конце пептидного антигена (A), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, состоит из незаряженных и гидрофобных аминокислот, которые помогают стимулировать образование частиц, и их обычно выбирают из одиночных аминокислот, таких как, глицин, серин, цитруллин, лейцин, норлейцин или метионин; дипептидов, таких как, Gly-Ser, Gly-Cit или Gly-Leu; трипептидов, таких как, Gly-Ser-Cit, Gly-Pro-Cit или Gly-Pro-Gly; тетрапептидов, таких как, Ser-Pro-Val-Cit, Ser-Pro-Val-Cit или Gly-Pro-Gly-Cit; пентапептидов, таких как, Gly-Ser-Val-Leu-Cit, Gly-Pro-Val-Leu-Cit; или гексапептидов, таких как, Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Cit или Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Cit, или Gly-Gly-Ser-Pro-Leu-Cit. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, применяется C-концевое удлинение (B2), которое включает одиночную заряженную аминокислоту, и его обычно выбирают из одиночной аминокислоты, такой как, аргинин или лизин; дипептидов, таких как, Gly-Arg (где Arg можно заменить на Lys); трипептидов, таких как, Gly-Ser-Arg (где Arg можно заменить на Lys); тетрапептидов, таких как, Gly-Pro-Gly-Arg (SEQ ID NO: 59), Gly-Ser-Val-Arg (SEQ ID NO: 60), Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), Asp-Leu-Val-Cit или Asp-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 63) (где Asp можно заменить на Glu, а Arg можно заменить на Lys); пентапептидов, таких как, Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 17) или Gly-Asp-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 64) или Gly-Asp-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 65); и гексапептидов, таких как, Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 13) или Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 61) (где Asp можно заменить на Glu, а Arg можно заменить на Lys); или Gly-Ser-Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 66) или Gly-Gly-Asp-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 67) (где Asp можно заменить на Glu, а Arg можно заменить на Lys). Удлинения B1, помещенные проксимально к заряженной молекуле (C) пептидных антигенных конъюгатов с суммарным отрицательным зарядом из Формулы V, при этом, заряженная молекула (C) сцеплена посредством N-конца пептидного антигена посредством удлинения B1, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, содержат заряженную аминокислоту, такую как, Asp или Glu, и их обычно выбирают из одиночных аминокислот, таких как, Cit, Leu, Arg или Lys; дипептидов, выбранных из Val-Cit, Leu-Cit, Val-Arg или Leu-Arg (где Arg можно заменить на Lys); трипептидов, выбранных из Pro-Val-Arg, Pro-Val-Cit, Gly-Val-Arg или Gly-Val-Cit (где Arg можно

заменить на Lys); или тетрапептидов, выбранных из Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 6), Ser-Pro-Leu-Cit, Ser-Leu-Val-Cit, Ser-Pro-Val-Cit, Asp-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 68), Asp-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 69), Asp-Leu-Val-Cit, Asp-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 63), Ser-Gly-Val-Cit или Asp-Pro-Val-Cit (где Arg можно заменить на Lys, а Asp можно заменить на Glu). Различные удлинения, B1 и B2, могут быть объединены с любой заряженной молекулой (C), пептидным антигеном (A), гидрофобной молекулой (H) или Частицей (P) для достижения Общего среднего значения гидропатии (GRAVY) и необходимого суммарного заряд пептидного антигенного конъюгата.

[00384] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат с суммарным отрицательным зарядом из Формулы V содержит заряженную молекулу (C), обычно содержащую от 6 до 14 отрицательно заряженных функциональных групп, например, (Glu)₆₋₁₄, которая сцеплена с N-концевым удлинением (B1) дипептида, например, Val-Cit, которое сцеплено с пептидным антигеном (A), который обычно содержит от 7 до 35 аминокислот, который сцеплен с C-концевым удлинением (B2), например, Ser-Pro-Val-Cit, то есть, сцеплен с Линкером (Lys(N3)-DVC0), который сцеплен с гидрофобной молекулой (H), состоящей из поли(аминокислот) Формулы I или Формулы II, сцепленной с адъювантами Формулы III.

[00385] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, добавление заряженной молекулы (C) и/или удлинений (B1 и B2) уменьшало значение GRAVY фрагмента пептидного антигена, содержащего пептидный антиген (A), и увеличивало суммарный заряд последовательности, что было связано с неожиданными улучшениями в изготовлении фрагмента пептидного антигена. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, добавление заряженной молекулы (C), содержащей, по меньшей мере, один аминокислотный остаток лизина (Lys) или аргинина (Arg), привело к успешному синтезу и очистке методом ВЭЖХ фрагмента пептидного антигена, содержащего пептидный антиген (A), который иным образом нельзя было бы изготовить в виде нативного пептидного антигена (то есть, нативного пептидного антигена без иных модификаций). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A), сцепленный с C-концевым удлинением (B2), состоящий из, по меньшей мере, одной аминокислоты пролина, псевдопролина (Pro), аргинина (Arg) или лизина (Lys), привел к успешному синтезу фрагмента пептидного антигена, содержащего пептидный антиген (A), который иным образом нельзя было бы изготовить в виде нативного пептидного антигена (то есть, нативного пептидного антигена без иных модификаций). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, добавление, по меньшей мере, одного ароматического амина, такого как,

фенилаланинамин, к фрагменту пептидного антигена или пептидному антигенному конъюгату, продуцированному полностью посредством твердофазного пептидного синтеза, привело к успешному синтезу фрагмента пептидного антигена или пептидного антигенного конъюгата, содержащего пептидный антиген (А), который иным образом нельзя было бы изготовить в виде нативного пептидного антигена (то есть, нативного пептидного антигена без иных модификаций).

Выбор пептидных антигенов (А) для применения в индивидуализированных противораковых вакцинах

[00386] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А), содержащий пептидный антигенный конъюгат, является специфическим для отдельного пациента. Пептидный антигенный конъюгат, содержащий пептидные антигены (А), которые являются специфическими для отдельных пациентов, можно применять для индивидуализированных методов терапии, например, для применения в качестве индивидуализированной противораковой вакцины или индивидуализированной вакцины для индуцирования толерантности или супрессии для лечения аутоиммунных заболеваний или аллергических реакций.

[00387] Выбор пептидных антигенов (А) для включения в индивидуализированную противораковую вакцину представляет собой многоэтапный процесс, при этом, некоторые этапы могут быть необязательными.

[00388] Первый этап включает идентификацию опухлеассоциированных антигенов, которые являются специфическими для опухоли или, по сравнению с нормальной тканью, сверхэкспрессируются опухолью. Соответственно, получают опухолевую ткань и здоровую ткань. Опухолевая ткань и здоровая ткань могут быть зафиксированы в формалине и залиты парафином или могут представлять собой свежeweделенную ткань. Здоровая ткань может представлять собой кровь, содержащую лейкоциты. Опухолевую ткань и здоровую ткань процессируют для выделения ДНК. Затем ДНК процессируют и секвенируют для идентификации различий между ДНК опухоли и ДНК здоровой ткани. Эти различия ДНК могут представлять собой изменения одиночного нуклеотида или динуклеотида, или нуклеотида более высокого порядка, которые приводят к несинонимичной мутации, вставкам и делециям, которые приводят к мутациям со сдвигом рамки, мутациям сайта сплайсинга, которые приводят к альтернативным вариантам сплайсинга или к стоп-кодонам, которые могут быть прочитаны, что приводит к делециям одиночной аминокислоты. Дальнейшие мутации могут быть возможны посредством хромосомных транслокаций или инверсий, или дупликаций. Существует множество способов проведения изменений на уровне ДНК,

которые могут вызвать появление аберрантных пептидных последовательностей и/или пептидов с аберрантными посттрансляционными модификациями, которые являются опухолеспецифическими и могут именоваться неоантигенами или прогнозируемыми неоантигенами.

[00389] Второй этап включает определение того обстоятельства, действительно ли опухолеассоциированные антигены, идентифицированные на этапе 1, экспрессируются опухолью. РНК опухоли выделяют, процессируют и секвенируют, чтобы определить, экспрессируются ли мутации, идентифицированные на этапе 1, в виде РНК опухолевыми клетками. Пептидные антигены (А), содержащие мутации, идентифицированные из ДНК-секвенирования опухоли и здоровой ткани, могут быть выбраны для включения в индивидуализированную противораковую вакцину на основе уровня экспрессии РНК. Кроме того, опухолеассоциированные собственные антигены, которые продуцируют более высокие уровни РНК в опухоли, по сравнению с незлокачественными тканями, могут быть выбраны в качестве пептидных антигенов (А) для включения. Мутации, при этом, РНК-транскрипт не идентифицирован, обычно не выбирают в качестве пептидного антигена (А) для включения в вакцину. Пептидные антигены (А), содержащие мутации или опухолеассоциированные собственные антигены, могут быть приоритетными на основе уровня экспрессии РНК мутантного пептида (то есть, неоантигена) или опухолеассоциированных собственных антигенов, например, мутации, экспрессируемые на более высоком уровне или опухолеассоциированные собственные антигены могут быть приоритетными. Можно применять одновременно несколько критериев при выборе пептидных антигенов (А) для включения в индивидуализированную противораковую вакцину. Например, уровень экспрессии РНК и прогнозируемая аффинность связывания МНС эпитопов, содержащихся в мутантном пептиде (то есть, в неоантигене) или опухолеассоциированном собственном антигене, могут применяться совместно, чтобы выбрать оптимальный набор пептидных антигенов (А) для включения в индивидуализированную противораковую вакцину. В таком сценарии, пептидный антиген (А), содержащий Т-клеточный эпитоп с умеренной выраженной аффинностью связывания, который имеет очень высокую экспрессию, может быть приоритетным, по сравнению с другим пептидным антигеном (А), содержащим Т-клеточный эпитоп, который имеет более высокую аффинность связывания, но экспрессируется опухолью на очень низком уровне.

[00390] Помимо этого следует учитывать, что клональная или консервативная мутация или опухолеассоциированный собственный антиген встречается в разных опухолевых клетках, которые содержат опухоль. Клональность мутации оценивают путем

сравнения частоты мутации с частотой варианта дикого типа в выделенной из опухоли ДНК. Опухولةассоциированные неоантигены или собственные антигены могут быть выбраны для применения в качестве пептидных антигенов (А) для включения в индивидуализированные противораковые вакцины, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов на основе клональности или близкой к клональности мутации, которую они содержат. Например, пептидные антигены (А) могут быть приоритетными для включения, если по прогнозам они будут присутствовать в > 50% опухолевых клеток, > 75% опухолевых клеток, > 85% опухолевых клеток, > 95% опухолевых клеток или > 99% опухолевых клеток.

[00391] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (А) для включения в индивидуализированную противораковую вакцину, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов, могут также быть приоритетными на основе прогнозируемого связывания эпитопов, содержащихся в антигене, для данной молекулы МНС класса I и/или класса II, как определено алгоритмом связывания *in silico*. В неограничивающем примере, тип МНС каждого субъекта сначала идентифицируют посредством секвенирования. Затем каждый мутантный пептид (то есть, неоантиген) или опухولةассоциированный собственный антиген, идентифицированный любыми подходящими средствами (например, секвенирование ДНК, экспрессия РНК или масс-спектрометрия), тестируют на предмет прогнозируемого связывания с каждой молекулой МНС, присутствующей у субъекта, которая, например, у пациентов-людей, может включать до 6 уникальных аллелей МНС Класса I. Существует несколько общедоступных алгоритмов, которые можно применять для прогнозирования связывания МНС, включая искусственную нейронную сеть netMHC, способ стабилизированной матрицы и алгоритм Консенсуса аналитических ресурсов и Базы данных по иммунным эпитопам (IEDB). Внутренние алгоритмы также могут быть применены. Пептидные антигены (А), которые содержат эпитоп с высокой прогнозируемой аффинностью связывания с большей вероятностью будут индуцировать иммунный ответ, чем пептидные антигены (А), содержащие эпитопы с низкой прогнозируемой аффинностью связывания. Неожиданное открытие, раскрытое в настоящем документе, заключается в том, что более 50% пептидных антигенов (А), включая прогнозируемые неоантигены, которые имеют эпитоп с прогнозируемой аффинностью связывания менее 0,5 перцентиля по алгоритму Консенсуса IEDB, способны генерировать Т-клеточные ответы (то есть, CD8 Т-клеточные ответы) при введении с применением иммуногенных композиций, содержащих пептидные антигенные конъюгаты, описанные в настоящем документе. На основании этого неожиданного открытия, пептидные антигены (А), включая пептидные

антигены (A), содержащие прогнозируемые неоантигены, которые содержат эпитоп с аффинностью связывания менее 0,5 процентиля по алгоритму Консенсуса IEDB, могут быть выбраны для применения в индивидуализированных противораковых вакцинах, содержащих пептидные антигенные конъюгаты.

[00392] Кроме того, полученное методом масс-спектрометрии подтверждение связывания антигена с МНС или разработанные на основе метода масс-спектрометрии алгоритмы связывания антигенов с МНС могут быть применены для выбора пептидных антигенов (A) для включения в индивидуализированную противораковую вакцину. В этом сценарии, опухолевую ткань процессируют для идентификации пептидов, которые связаны с молекулами МНС. Пептиды, которые идентифицированы на поверхности опухолевых клеток, но не здоровых клеток, которые могут представлять собой мутантные пептиды (то есть, неоантигены), протеасомальные варианты сплайсинга или опухолеассоциированные собственные антигены, могут быть приоритетными для включения в индивидуализированную противораковую вакцину. Неожиданное открытие, раскрытое в настоящем документе, заключается в том, что высокая доля (то есть, 7 из 7) прогнозируемых неоантигенов, которые были выбраны для применения в индивидуализированной противораковой вакцине на основе подтвержденного масс-спектрометрией связывания с МНС-I на опухолевых клетках, привела к высокой интенсивности CD8 Т-клеточных ответов при доставке в виде пептидного антигена (A) в иммуногенных композициях, содержащих пептидный антигенный конъюгат, что дает основание предполагать, что масс-спектрометрия или прогнозирующие алгоритмы на основе масс-спектрометрии могут быть надежными фильтрами для выбора неоантигенов для применения в качестве пептидных антигенов (A) в индивидуализированных противораковых вакцинах, состоящих из пептидных антигенных конъюгатов.

[00393] Пептидные антигены (A) также могут быть выбраны для включения на основе анализа распознавания Т-клеток. Например, можно применить анализ, в котором синтетические пептиды (или экспрессирующие системы, которые продуцируют пептид *in situ*), содержащие прогнозируемые неоантигены или опухолеассоциированные собственные антигены, добавляют *in vitro* в культуру Т-клеток, полученных из крови, опухолевой ткани или иной ткани субъекта. Распознавание Т-клеток данного пептида может быть оценено, например, посредством метода иммуноферментных пятен (ELISpot) или посредством проточной цитометрии. Антигены, распознаваемые в анализе Т-клеток *in vitro*, могут быть приоритетными для включения в качестве пептидного антигена (A) в индивидуализированную вакцину, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов.

[00394] Наконец, пептидные антигены (А) могут быть выбраны на основе любого количества прогнозирующих алгоритмов. Могут применяться пептидные антигены (А), которые, по прогнозам, будут иммуногенными или эффективными на основе прогнозирующих алгоритмов, разработанных для больших наборов данных. Кроме того, прогнозирующие алгоритмы могут быть применены для выбора пептидных неоантигенов, которые, по прогнозам, приводят к Т-клеточным ответам, которые являются специфическими для мутантного эпитопа, но не для эпитопа дикого типа, то есть, для Т-клеток, которые не являются перекрестно-реагирующими для собственных антигенов.

[00395] Любая комбинация вышеуказанных способов может быть применена для идентификации и выбора пептидных антигенов (А), содержащих неоантигены или опухолеассоциированные собственные антигены, или тому подобное, для применения в индивидуализированной противораковой вакцине, состоящей из пептидных антигенных конъюгатов.

Длина пептидного антигена (А) и влияние на индукцию CD8 и CD4 Т-клеточных ответов для индивидуализированных противораковых вакцин

[00396] Однонуклеотидный полиморфизм, который приводит к несинонимичной аминокислотной замене, может появляться в любом положении в пептидном эпитопе, который связывается с МНС Класса I, который обычно имеет длину 8-13 аминокислот. Следовательно, чтобы охватить все возможные эпитопы, которые могут связывать данный МНС Класса I, пептидный антиген (А), содержащий неоантиген для применения в индивидуализированной противораковой вакцине, может включать 12 аминокислот с обеих сторон несинонимичной мутации, образуя пептид длиной 25 аминокислот, с мутантной аминокислотой в качестве среднего (13-го) остатка. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А) может включать только минимальный эпитоп (8-13 аминокислот в длину), который, по прогнозам, будет связываться с МНС Класса I. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, индивидуализированная противораковая вакцина может содержать как пептидный антиген (А), содержащий неоантиген из 25 аминокислот, так и пептидный антиген (А), содержащий только прогнозируемый минимальный эпитоп неоантигена.

[00397] Пептид-связывающий карман МНС Класса II обычно связывает пептиды из 12-16 аминокислот и в некоторых присутствуют, по меньшей мере, 20 аминокислот. Следовательно, индивидуализированная противораковая вакцина, которая состоит из пептидных антигенов (А), которые содержат только прогнозируемые связывающие Класс I минимальные эпитопы (которые обычно имеют длину 8-13 аминокислот), вряд ли будут

индуцировать CD4 Т-клеточные ответы. Однако противораковая вакцина, которая содержит пептидные антигены (А), состоящие из 25 аминокислот (или «25-мерные»), может, но не всегда, индуцировать CD4 Т-клеточные ответы, направленные на данную мутацию.

[00398] Пептидный антиген (А), состоящий из 25 аминокислот (или «25-мерный»), в противораковой вакцине может индуцировать более низкий уровень CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с пептидным антигеном (А), содержащим точный минимальный эпитоп, состоящий из ~ 7-12 аминокислот, возможно, из-за различий в эффективности процессинга и презентации пептидных антигенов разной длины в растворимой органической фракции. Таким образом, пептидные антигены (А), состоящие из 25 аминокислот, включенные в противораковую вакцину, могут приводить к более низкой интенсивности CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с интенсивностью ответов, индуцированных пептидными антигенами (А), содержащими минимальные эпитопы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А), состоящий из 25 аминокислот, включенный в противораковую вакцину, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов, не приводит к детектируемым CD8 Т-клеточным ответам, тогда как пептидный антиген (А), состоящий из 7-12 аминокислот, содержащий точный минимальный эпитоп, приводит к детектируемым CD8 Т-клеточным ответам. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (А), состоящий из 25 аминокислот, включенный в противораковую вакцину, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов, приводит к детектируемым CD4 Т-клеточным ответам, тогда как пептидный антиген (А), состоящий из 7-12 аминокислот, содержащий точный минимальный эпитоп, не приводит к детектируемым CD4 Т-клеточным ответам. На основании этих неожиданных открытий, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, две длины пептидных антигенов (А), содержащих один и тот же эпитоп, как минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп (именуемый «Min» или минимальным эпитопом (ME)), так и пептид, содержащий 25 аминокислот (именуемый синтетическим длинным пептидом (SLP) или длинным пептидом), могут быть включены в качестве пептидных антигенов (А) в индивидуализированные противораковые вакцины, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (А), которые состоят из минимальных CD4 и CD8 Т-клеточных эпитопов, включены в индивидуализированную противораковую вакцину, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (А), состоящие из минимальных CD8 Т-клеточных и

пептидных антигенов (A), содержащих универсальный CD4 T-клеточный эпитоп и необязательные пептидные антигены (A), состоящие из минимальных CD4 T-клеточных эпитопов, включены в индивидуализированные противораковые вакцины, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидные антигены (A), включенные в индивидуализированную противораковую вакцину, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов, содержат от 7 до 35 аминокислот, обычно от 15 до 35 аминокислот, например, 25 аминокислот.

Комбинированная иммунотерапия

[00399] Пептидные антигенные конъюгаты, раскрытые в настоящем документе, могут применяться в иммуногенных композициях для лечения опухолей или инфекционных заболеваний. Пептидные антигенные конъюгаты можно применять отдельно или в комбинации с другими видами терапии. При лечении раковых заболеваний, иммуногенные композиции, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов, могут применяться до, во время или после любой формы лечения, такой как, хирургия, лучевая терапия или химиотерапия. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, применяются в комбинации с иммуномодуляторами, такими как, цитокины (например, IL-2), противоопухолевые антитела, антитела ингибиторов контрольных точек (например, анти-PD1) или другие малые молекулы или биологические препараты, которые вызывают обратную иммуносупрессию, непосредственно убивают опухолевые клетки или усиливают иммунный ответ против опухоли. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, противораковая вакцина на основе пептидных антигенных конъюгатов предлагается опухоленесущему субъекту в комбинации с ингибитором контрольной точки (например, анти-PD1, анти-PDL1-анти-CTLA4). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, противораковая вакцина, например, индивидуализированная противораковая вакцина, предлагается субъекту до введения ингибитора контрольной точки. Пептидные антигенные конъюгаты, раскрытые в настоящем документе, также могут применяться в гетерологичной иммунизации в режиме «прайм-буст», в таком как, режим «прайм» или «буст» с пептидным антигенным конъюгатом и режим «прайм» или «буст» с гетерологичной вакциной, такой как, вирусный вектор.

Состав композиции

[00400] Иммуногенные композиции, состоящие из пептидных антигенных конъюгатов, раскрытых в настоящем документе, могут быть составлены в виде

фармацевтических композиций, получаемых для введения субъекту, и которые включают терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, одного иммуногена, как описано в настоящем документе. Терапевтически эффективное количество раскрытого соединения будет зависеть от пути введения, вида субъекта и физических характеристик субъекта, которому проводят лечение. Специфические факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают тяжесть и стадию заболевания, вес, диету и виды сопутствующей лекарственной терапии. Взаимосвязь этих факторов с определением терапевтически эффективного количества раскрытых соединений понятна специалистам в данной области техники.

[00401] Иммуногенные композиции для введения субъекту могут представлять собой фармацевтические композиции и могут включать, по меньшей мере, одну дополнительную фармацевтически приемлемую добавку, такую как, носители, загустители, разбавители, буферные растворы, консерванты, поверхностно-активные агенты и тому подобное, в дополнение к выбранной молекуле. Иммуногенные композиции также могут включать, по меньшей мере, один дополнительный активный ингредиент, такой как, противомикробный агент, анестетик и тому подобное. Фармацевтически приемлемые носители, применяемые для этих составов, являются стандартными. В работе «*Фармацевтические науки Ремингтона*», Э.У. Мартина, Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, 19е издание (1995), описаны композиции и составы, пригодные для фармацевтической доставки соединений, описанных в настоящем документе.

[00402] В целом, характер носителя будет зависеть от конкретного применяемого режима введения. Например, парентеральные составы обычно содержат инъекционные жидкости, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как, вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или тому подобное в качестве транспортера. В дополнение к биологически нейтральным носителям, фармацевтические композиции для введения могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как, увлажняющие или эмульгирующие агенты, консерванты и буферизирующие агенты для поддержания pH и тому подобное, например, ацетат натрия или сорбитанмонолаурат.

[00403] Для составления иммуногенных композиций, раскрытые компоненты наночастиц или раствор, содержащий раскрытые компоненты наночастиц, можно комбинировать с различными фармацевтически приемлемыми добавками, а также с основой или носителем для диспергирования наночастиц. Желаемые добавки включают, но этим не ограничиваются, агенты, регулирующие pH, такие как, аргинин, гидроксид

натрия, глицин, соляная кислота, лимонная кислота и тому подобное. Кроме того, могут быть включены местные анестетики (например, бензиловый спирт), изотонизирующие агенты (например, хлорид натрия, маннит, сорбит), адсорбционные ингибиторы (например, Твин 80 или Миглиол 812), агенты, усиливающие растворимость (например, циклодекстрины и их производные), стабилизаторы (например, сывороточный альбумин) и восстановители (например, глутатион). Адьюванты, такие как, гидроксид алюминия (например, Амфогель, Уайет Лабораториз, Мэдисон, Нью-Джерси), адьювант Фрейнда, MPL™ (3-О-деацелированный монофосфориллипид А; Корикса, Гамильтон, Индиана) и PL-12 (Генетикс Инститют, Кембридж, Массачусетс), среди многих других подходящих адьювантов, широко известных в данной области техники, могут быть включены в композиции. Когда композиция представляет собой жидкость, тоничность состава, измеренную по отношению к тоничности 0,9% (об.%) физиологического солевого раствора, принимаемого за единицу, обычно доводят до значения, при котором не будет индуцировано существенное необратимое повреждение ткани в сайте введения. Обычно тоничность раствора доводят до значения от, примерно, 0,3 до, примерно, 3,0, например, от, примерно, 0,5 до, примерно, 2,0 или от, примерно, 0,8 до, примерно, 1,7.

[00404] Иммуногенные композиции по настоящему изобретению обычно являются стерильными и стабильными в условиях изготовления, хранения и применения. Стерильные растворы могут быть получены путем включения соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных в настоящем документе, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения соединения и/или другого биологически активного агента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты среди перечисленных в настоящем документе. В случае стерильных порошков, способы получения включают вакуумную сушку и сушку вымораживанием с выходом порошка соединения плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно простерилизованного фильтрованием. Предотвращения действия микроорганизмов можно достичь посредством различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, посредством парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного.

[00405] Настоящее изобретение также включает наборы, упаковки и мультиконтейнерные блоки, содержащие описанные в настоящем документе иммуногенные композиции, активные ингредиенты и/или средства для их введения для применения в профилактике и лечении заболеваний и других состояний здоровья у

субъектов-млекопитающих. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, эти наборы включают контейнер или состав, который содержит, по меньшей мере, одну иммуногенную композицию, описанную в настоящем документе. В одном примере, иммуногенная композиция составлена в виде фармацевтического препарата для доставки субъекту. В одном примере, иммуногенная композиция необязательно содержится в дозирующем контейнере в виде ангро, или в моноблочной или мультиблочной упаковке в виде лекарственной формы. Могут быть предложены и дополнительные дозирующие средства, например, аппликатор для ингаляционного или интраназального распыления. Упаковочные материалы необязательно включают этикетку или инструкцию, указывающую, для каких лечебных целей и/или каким образом можно применять упакованный в них фармацевтический агент.

Способы индуцирования иммунного ответа

[00406] Иммуногенные композиции, включающие пептидный антиген (А), как описано в настоящем документе, можно применять для того, чтобы индуцировать выработку иммунного ответа на пептидный антиген (А) у субъекта. Субъекты, которым могут быть полезны способы, раскрытые в настоящем изобретении, включают людей и ветеринаров.

[00407] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, выбирают для лечения субъект, у которого развилась или имеется риск развития инфекции от инфекционного агента, который содержит пептидный антиген, например, из-за воздействия или возможности воздействия инфекционного агента. После введения терапевтически эффективного количества раскрытой иммуногенной композиции, субъекта можно подвергнуть мониторингу на предмет наличия инфекции, симптомов, ассоциированных с инфекцией, или применить и то, и другое.

[00408] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, выбирают для лечения субъект, у которого развилась или имеется риск развития рака, такого как злокачественная опухоль. После введения терапевтически эффективного количества раскрытого иммуногена, субъекта можно подвергнуть мониторингу на предмет наличия рака, уменьшения объема опухоли, любого соответствующего симптома рака или их комбинации.

[00409] Типичные субъекты, для которых предназначено лечение терапевтическими средствами и способами по настоящему изобретению, включают людей, а также нечеловекоподобных приматов и других животных. Для идентификации субъектов в целях профилактики или лечения в соответствии со способами по настоящему изобретению, применяют общепринятые способы скрининга для определения факторов

риска, ассоциированных со специфическим или предполагаемым заболеванием или состоянием здоровья, или для определения статуса существующего заболевания или состояния здоровья у субъекта. Эти способы скрининга включают, например, стандартные исследования для определения экологических, семейных, профессиональных и других факторов риска, которые могут быть ассоциированы со специфическим или предполагаемым заболеванием или состоянием здоровья, а также диагностические способы, такие как, различные ELISA и другие способы иммуноанализа, которые доступны и широко известны в данной области техники для определения и/или характеристики заболевания или состояния здоровья. Эти и другие рутинные способы позволяют врачу отбирать пациентов, нуждающихся в терапии, с применением способов и фармацевтических композиций по настоящему изобретению. В соответствии с этими способами и принципами, композицию можно вводить в соответствии с приведенными в настоящем документе указаниями или другими стандартными способами, известными специалисту обычной квалификации в данной области техники, в качестве независимой программы профилактики или лечения, или в качестве последующего врачебного наблюдения, схемы лечения, дополняющей или координирующей другие виды лечения.

[00410] Введение терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции, включающей пептидный антиген, как описано в настоящем документе, может быть осуществлено в профилактических или терапевтических целях. При профилактическом применении, иммуногенную композицию предлагают до наступления любых симптомов, например, перед инфекцией или развитием опухоли. Профилактическое введение иммуногенной композиции служит для предотвращения или устранения последующего развития заболевания или состояния здоровья. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы включают выбор субъекта, у которого имеется риск заражения инфекцией или развития опухоли, и введение терапевтически эффективного количества раскрытого терапевтически эффективного количества раскрытой иммуногенной композиции. Таким образом, иммуногенная композиция может быть предложена до предполагаемого воздействия инфекционного агента или развития опухоли, чтобы ослабить ожидаемую тяжесть, продолжительность или масштаб инфекции или опухоли, и/или любые ассоциированные симптомы заболевания.

[00411] При терапевтическом применении, раскрытая иммуногенная композиция может быть предложена во время или после начала симптома заболевания или состояния здоровья, например, после развития симптома инфекции или диагностики инфекции, или развития симптома опухоли, или диагностики опухоли. Лечение инфекции или опухоли

может включать задержку и/или уменьшение признаков или симптомов инфекции, или опухоли у субъекта. В некоторых примерах, лечение с применением раскрытых в настоящем документе способов продлевает время выживания субъекта.

[00412] Иммуногенную композицию можно применять в протоколах координированной иммунизации или в комбинаторных составах.

[00413] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, терапевтически эффективное количество раскрытой иммуногенной композиции может быть введено субъекту, подвергаемому лечению, или для ингибирования инфекционного агента у субъекта. Инфекционный агент представляет собой агент, который может инфицировать субъект, включая, но этим не ограничиваясь, вирусы, бактерии и грибки. Для лечения может быть выбран субъект, у которого подозревают или имеется риск развития инфекции инфекционным агентом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инфекционный агент представляет собой вирус, бактерию или грибок, как описано выше, а пептидный антиген включает антиген из конкретного вируса, бактерии или грибка.

[00414] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, терапевтически эффективное количество раскрытой иммуногенной композиции может быть введено субъекту, подвергаемому лечению, или для ингибирования опухоли и/или рака у субъекта. Для лечения может быть выбран субъект, у которого подозревают или имеется риск развития опухоли и/или рака. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, лечение опухоли и/или рака у субъекта уменьшает рост и/или пролиферацию опухоли. Опухоль может представлять собой любую интересующую опухоль и может быть доброкачественной или злокачественной.

[00415] Лечение опухоли обычно начинают после диагностики опухоли или после начала предшествующего состояния здоровья (такого как, дисплазия или развитие доброкачественной опухоли). Лечение может быть начато на ранних стадиях рака, например, может быть начато до того, как у субъекта проявятся симптомы состояния здоровья, например, во время диагностики стадии I или во время диагностики дисплазии. Однако лечение может быть начато во время любой стадии заболевания, такой как, но этим не ограничиваясь, стадия I, стадия II, стадия III и стадия IV рака. В некоторых примерах, лечение вводят этим субъектам при наличии доброкачественной опухоли, которая может преобразоваться в злокачественную или даже метастатическую опухоль.

[00416] Лечение, начатое после развития состояния здоровья, такого как, злокачественный рак, может привести к уменьшению тяжести симптомов одного из состояний здоровья или к полному устранению симптомов, или к уменьшению

метастазирования, объема опухоли или количества опухолей. В некоторых примерах, опухоль становится неопределяемой после лечения. В одном аспекте настоящего изобретения, образование опухолей, таких как, метастазирование, задерживается, предотвращается или уменьшается. В другом аспекте, размер первичной опухоли уменьшается. В дополнительном аспекте, симптом опухоли уменьшается. В еще одном аспекте, объем опухоли уменьшается.

[00417] Субъекты могут быть подвергнуты скринингу до начала раскрытых способов терапии, например, чтобы определить, имеется ли у субъекта опухоль. Присутствие опухоли может быть определено способами, известными в данной области техники, и они обычно включают цитологическую и морфологическую оценку. Опухоль может быть развившейся опухолью. Клетки могут быть *in vivo* или *ex vivo*, включая клетки, полученные из биопсии. Наличие опухоли указывает на то, что опухоль можно лечить с применением способов, предложенных в настоящем документе.

[00418] Терапевтически эффективное количество будет зависеть от тяжести заболевания и общего состояния здоровья пациента. Терапевтически эффективное количество представляет собой такое количество, которое предлагает либо субъективное облегчение симптома(ов), либо объективно идентифицируемое улучшение, как отмечено врачом или другим квалифицированным наблюдателем. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, терапевтически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для ингибирования роста опухоли, или количество, которое эффективно для уменьшения признака или симптома опухоли. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, терапевтически эффективное количество представляет собой количество, необходимое для ингибирования инфекции инфекционным агентом, или количество, которое эффективно для уменьшения признака или симптома инфекции. Терапевтически эффективное количество вводимых агентов может варьироваться, в зависимости от желаемых эффектов и подвергаемого лечению субъекта. В некоторых примерах, терапевтические количества представляют собой количества, которые устраняют или уменьшают массу опухоли пациента, или которые предотвращают или уменьшают пролиферацию метастатических клеток, или которые уменьшают нагрузку инфекционного агента у субъекта.

[00419] Фактическое дозирование иммуногенной композиции будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как признак заболевания и конкретный статус субъекта (например, возраст субъекта, размер, физическая форма, степень выраженности симптомов, факторы восприимчивости и тому подобное), время и путь введения, другие лекарственные препараты или способы лечения, вводимые одновременно, а также

специфическая фармакология соединения для индуцирования выработки желаемой активности или биологического ответа у субъекта. Режимы дозирования могут быть скорректированы с предложением оптимального профилактического или терапевтического ответа. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или пагубные побочные эффекты соединения и/или другого биологически активного агента перевешиваются в плане клинических условий терапевтически полезными эффектами.

[00420] Дозирование может варьироваться лечащим врачом для поддержания желаемой концентрации в сайте-мишени (например, в легких или большом круге кровообращения). Более высокие или более низкие концентрации могут быть выбраны на основе режима доставки, например, трансэпидермальной, ректальной, пероральной, ингаляционной, внутрикостной или интраназальной доставки, по сравнению с внутривенной или подкожной, или внутримышечной доставкой. Дозирование также может быть скорректировано, исходя из скорости высвобождения вводимого состава, например, интраингаляционный спрей, по сравнению с порошком, перорально вводимый состав продолжительного усвоения, по сравнению инъекционным дисперсным составом или составами с трансдермальной доставкой и так далее.

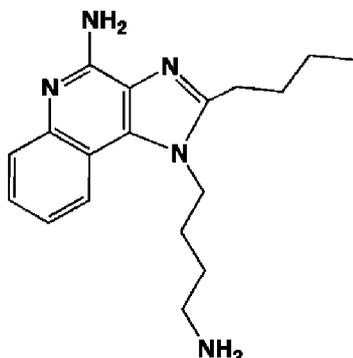
[00421] Любой способ введения может быть применен для раскрытых терапевтических агентов, включая местное и системное введение. Например, можно применять топическое, пероральное, внутрисосудистое, такое как, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, интраназальное, внутрикожное, интратекальное и подкожное введение. Конкретный режим введения и режим дозирования будут выбраны лечащим врачом с учетом особенностей случая (например, субъект, заболевание, соответствующая стадия заболевания и тот факт, является ли лечение профилактическим). В случаях, когда вводят более одного агента или более одной композиции, можно применять, по меньшей мере, один путь введения.

[00422] Раскрытые терапевтические агенты могут быть составлены в виде лекарственной формы с однократной дозировкой, подходящей для индивидуального введения точных доз. Кроме того, раскрытые терапевтические агенты могут вводиться в виде однократной дозы или в виде схемы с многократными дозам. Схема с многократными дозами – это схема, в которой первичный курс лечения может включать более одной отдельной дозы, например 1-10 доз, после чего вводят другие дозы в последующие промежутки времени, необходимые для поддержания или усиления действия композиций. Лечение может включать ежедневные или многодневные дозы соединения(й) в течение периода от нескольких дней до месяцев или даже лет. Таким

образом, режим дозирования также будет, по меньшей мере, частично, определяться на основе конкретных потребностей субъекта, подвергаемого лечению, и будет зависеть от оценки практикующего врача.

ПРИМЕРЫ

[00423] Соединение 1



[00424] **Соединение 1**, 1-(4-аминобутил)-2-бутил-1*H*-имидазо[4,5-*c*]хинолин-4-амин, именуемое как 2В, синтезировали по схеме, показанной на **Фигуре 3**.

[00425] **1-с**. Начиная с 2,4-хинолиндиола, промежуточное соединение, **1-б**, получали, как описано ранее (Линн Г.М., и др., *Nat Biotechnol* 33(11): 1201-1210, 2015). К 21 г 1-б (87,8 ммоль, 1 экв.) в 210 мл триэтиламина (ТЕА) (10% по массе) добавили 16,34 г (87,8 ммоль, 1 экв.) *N*-вос-1,4-бутандиамина, энергично встряхивая. Реакционную смесь нагревали до 70° С и контролировали с помощью ВЭЖХ, которая подтвердила, что реакцию завершили через 2 часа. Триэтиламин удаляли в вакууме и полученное масло растворяли в 200 мл дихлорметана и затем промывали 3 раза в 100 мл DI H₂O (деионизированная вода). Органический слой высушивали с помощью Na₂SO₄ и затем удаляли в вакууме, и полученное масло перетирали со смесью 1: 1 (об:об) гексана и диэтилового эфира с выходом 30,7 г желтых кристаллов **промежуточного соединения 1-с**. Масс-спектрометрию (химическая ионизация при атмосферном давлении) (MS (APCI)), рассчитывали для C₁₈H₂₃ClN₄O₄, *масса/заряд* 394,1, результат составил 394,9.

[00426] **1-д**. 30,7 г (76,4 ммоль) промежуточного соединения **1-с** растворяли в 300 мл этилацетата в Реакционном сосуде Парра, который барботировали аргоном, после чего добавляли 3 г 10% платины на углероде. Реакционный сосуд выдерживали в атмосфере аргона, а затем вакуумировали и повышали давление с помощью H₂(г) несколько раз перед повышением давления до 55 фунтов/кв.дюйм H₂(г), энергично встряхивая. H₂(г) непрерывно добавляли до тех пор, пока давление не стабилизировалось при 55 фунтов/кв.дюйм, после чего было определено, что реакция завершена. Реакционную смесь из Реактора Парра затем фильтровали через конец целита, упаривали досуха с получением желтого масла, которое перетирали со смесью 1: 1 гексана/эфира с выходом

белых кристаллов, которые собирали фильтрацией с выходом 27,4 г спектроскопически чистых белых кристаллов **1-d**. MS (APCI) рассчитывали для $C_{18}H_{25}ClN_4O_2$, *масса/заряд* 364,2, результат составил 365,2.

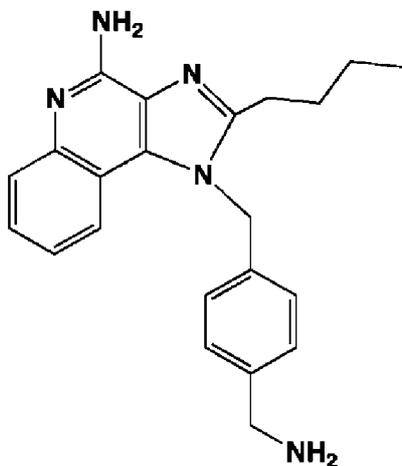
[00427] **1-e**. К 10 г (27,4 ммоль, 1 экв.) **1-d** в 50 мл тетрагидрофурана (ТГФ) добавляли 7,7 мл триэтиламина (54,8 ммоль, 2 экв.), после чего добавляли по каплям 3,6 г валероилхлорида (30,1 ммоль, 1,1 экв.) в 30 мл ТГФ, энергично встряхивая, пока реакционная смесь была на льду. Через 90 минут, ледяную баню удаляли и ТГФ удаляли в вакууме, с получением желтого масла, которое растворяли в 100 мл дихлорметана (DCM), которое промывали 3 раза в 50 мл 100 мл ацетатного буфера с pH 5,5. DCM удаляли в вакууме в масле, которое перетирали с этилацетатом, с получением 10,4 г белого твердого вещества, которое растворяли в метаноле с 1 г CaO (s), которое нагревали при 100° С в течение 5 часов, энергично встряхивая. Реакционную смесь фильтровали и высушивали с выходом 10,2 г грязно-белого твердого вещества, промежуточного соединения, **1-e**. MS (ионизация электрораспылением (ESI)) рассчитывали для $C_{23}H_{31}ClN_4O_2$, *масса/заряд* 430,21, результат составил 431,2.

[00428] **1-f**. К 10,2 г (23,7 ммоль, 1 экв.) **1-e** добавляли 30,4 г (284 ммоль, 12 экв.) бензиламиновой жидкости, которую нагревали до 110° С, энергично встряхивая. Реакцию завершили через 10 часов, и реакционную смесь добавляли к 200 мл этилацетата и промывали 4 раза в 100 мл 1 молярного раствора HCl. Органический слой высушивали с помощью Na_2SO_4 и затем удаляли в вакууме, и полученное масло перекристаллизовывали из этилацетата с получением 10,8 г спектроскопически чистых белых кристаллов промежуточного соединения, **1-f**. MS (ESI) рассчитывали для $C_{30}H_{39}N_5O_2$, *масса/заряд* 501,31, результат составил 502,3.

[00429] **Соединение 1**. 10,8 г (21,5 ммоль) **1-f** растворяли в 54 мл концентрированной (> 98%) H_2SO_4 и реакционную смесь энергично встряхивали в течение 3 часов. Через 3 часа, вязкую красную реакционную смесь медленно добавляли к 500 мл DI H_2O , энергично встряхивая. Реакционную смесь встряхивали в течение 30 минут и затем фильтровали через целит, после чего добавляли 10 молярный раствор NaOH до тех пор, пока pH раствора не стал ~ pH 10. Затем водный слой экстрагировали 6 раз в 200 мл DCM, и полученный органический слой высушивали с помощью Na_2SO_4 и восстанавливали в вакууме с выходом спектроскопически чистого белого твердого вещества. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,03 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,41 (t, J = 7,41 Hz, 1H), 7,25 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,47 (s, 2H), 4,49 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,91 (t, J = 7,78 Hz, 2H), 2,57 (t, J = 6,64 Hz, 1H), 1,80 (m, 4H), 1,46 (sep, J = 7,75 Hz, 4H), 0,96 (t, J =

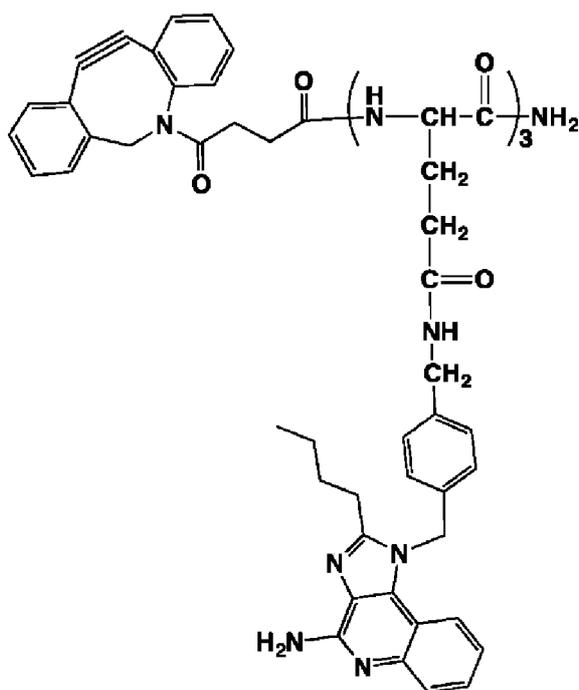
7,4 Hz, 3H). MS (ESI) рассчитывали для $C_{18}H_{25}N_5$, масса/заряд 311,21, результат составил 312,3.

[00430] **Соединение 2**



[00431] **Соединение 2**, 1-(4-(аминометил)бензил)-2-бутил-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин, именуемое как 2ВХу, было ранее описано (см. Линн Г.М., *и др.*, Характеристика *in vivo* физико-химических свойств сцепленных с полимером агонистов TLR, которые усиливают иммуногенность вакцины. *Nat Biotechnol* 33(11): 1201-1210, 2015, и Шукла Н.М., *и др.*, Синтез флуоресцентных конъюгатов имидазохинолина в качестве зондов Толл-подобного рецептора 7. *Bioorg Med Chem Lett* 20(22):6384-6386, 2010). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,77 (dd, $J = 8,4, 1,4$ Hz, 1H), 7,55 (dd, $J = 8,4, 1,2$ Hz, 1H), 7,35 – 7,28 (m, 1H), 7,25 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,06 – 6,98 (m, 1H), 6,94 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,50 (s, 2H), 5,81 (s, 2H), 3,64 (s, 2H), 2,92–2,84 (m, 2H), 2,15 (s, 2H), 1,71 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,36 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 0,85 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). MS (APCI) рассчитывали для $C_{22}H_{25}N_5$, масса/заряд 359,2, результат составил 360,3.

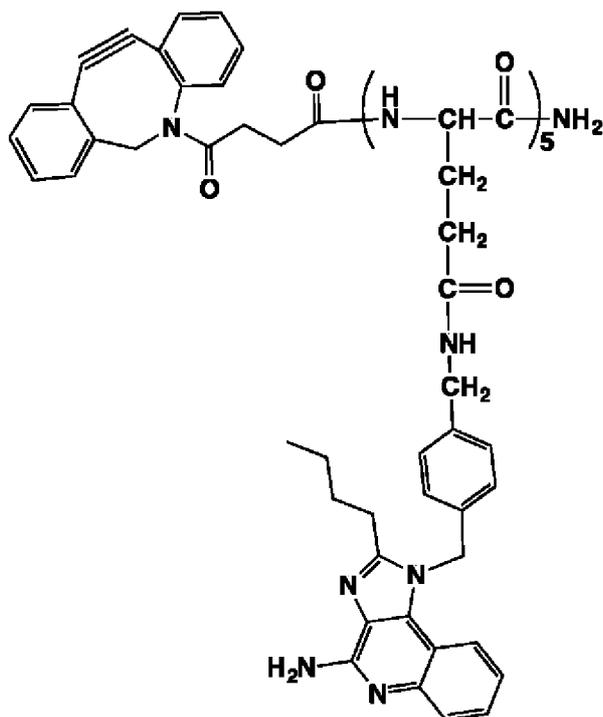
[00432] **Соединение 3**



[00433] **Соединение 3**, именуемое как DBCO-2ВХу₃, 2ВХу₃ или DBCO-(Glu(2ВХу)₃), синтезировали, начиная с предшественника Fmoc-(Glu)₃-NH₂, полученного твердофазным пептидным синтезом. 50 мг Fmoc-(Glu)₃-NH₂ (0,08 ммоль, 1 экв.), 143 мг **Соединения 2** (0,40 ммоль, 5 экв.), 84 мг 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) (0,48 ммоль, 6 экв.) и 48,5 мг 4-метилморфолина (NMM) (0,48 ммоль, 6 экв.) добавляли к 3,25 мл DMSO, энергично встряхивая при комнатной температуре в окружающей воздушной среде. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ (Площадь под фармакокинетической кривой (AUC) 254 нм). Через 30 минут добавляли 1 дополнительный эквивалент **Соединения 2** и 2 дополнительных эквивалента как CDMT, так и NMM. Через 2 часа реакцию завершили, и реакционную смесь добавляли к 50 мл 1 молярного раствора HCl для осаждения промежуточного соединения, защищаемого Fmoc, которое собирали путем центрифугирования раствора при ускорении 3000 g при температуре 4° C в течение 10 минут. Раствор HCl отбрасывали и промежуточное соединение, защищаемое Fmoc, собирали в виде твердого белого пеллета. Белое твердое вещество повторно суспендировали в 50 мл 1 молярного раствора HCl и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° C в течение 5 минут; 1 молярный раствор HCl отбрасывали, и продукт собирали в виде твердого пеллета. Этот процесс повторяли, а затем твердое вещество собирали и высушивали в вакууме с выходом 156,1 мг промежуточного соединения, защищаемого Fmoc, с количественным выходом. Затем продукт, защищаемый Fmoc, добавляли к 1,5 мл 20% раствора пиперидина в диметилформамиде (DMF) в течение 30 минут при комнатной температуре с выходом продукта со снятой защитой, который затем осаждали из 50 мл эфира и

центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° С в течение 30 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем дважды промывали эфиром, после чего высушивали в вакууме с выходом 126,4 мг промежуточного соединения. Затем 60 мг полученного промежуточного соединения, NH₂-(Glu-2BХу)₃-NH₂, (0,042 ммоль, 1 экв.) вводили в реакцию с 18,6 мг (0,046 ммоль, 1,1 экв.) эфира DBCO-NHS (Скоттсдейл, Аризона, США) и 8,5 мкл триэтиламина (0,084 ммоль, 2 экв.) в 1 мл DMSO в течение 6 часов при комнатной температуре. Полученный продукт, **Соединение 3**, очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-70% ацетонитрил/Н₂О (0,05% трифторуксусная кислота (TFA)) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Проводили элюирование продукта в течение 7,0 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 40,12 мг (выход 55,7%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₀₀H₁₀₆N₂₀O₈, *масса/заряд* 1714,85, результат составил 858,9 (M/2)⁺

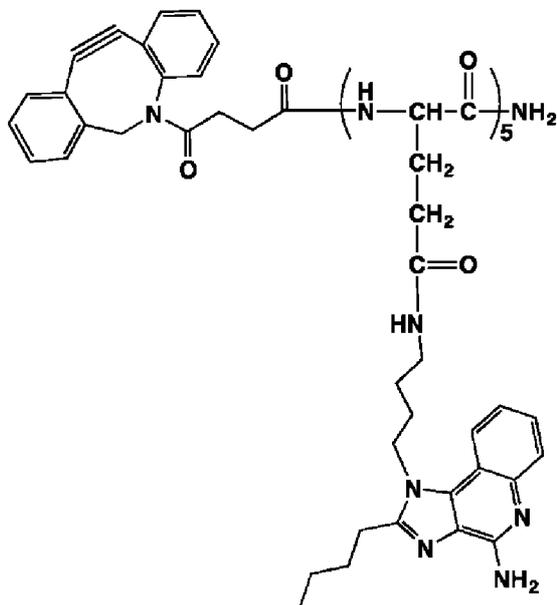
[00434] **Соединение 4**



[00435] **Соединение 4**, именуемое как DBCO-2BХу₅, 2BХу₅ или DBCO-(Glu(2BХу)₅), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-(Glu)₅-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 2**. **Соединение 4** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 38-48% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 8,0 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем

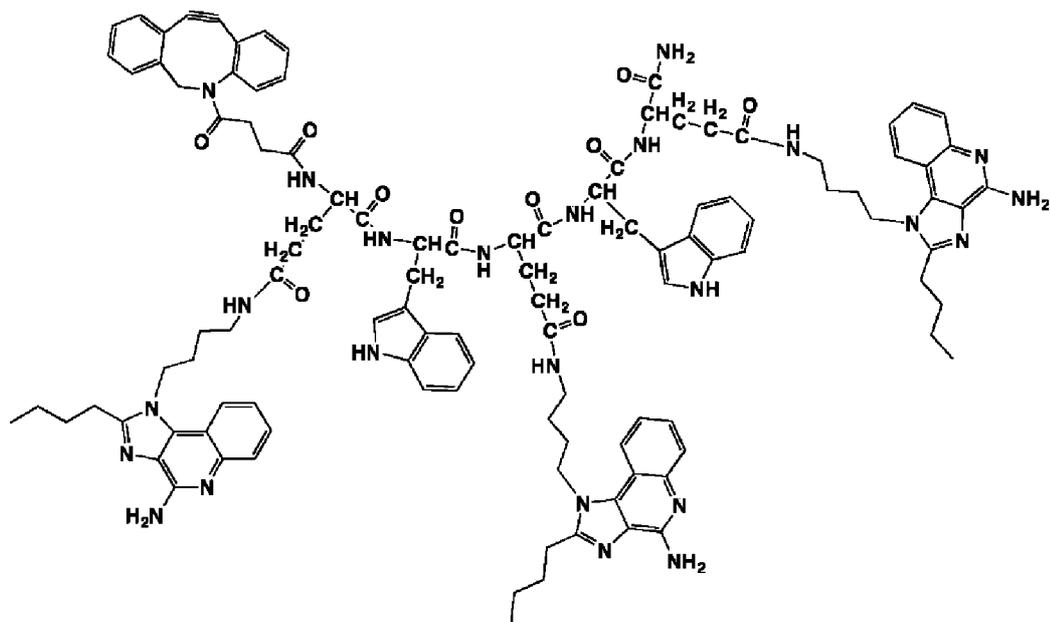
лиофилизировали с получением 45,9 мг (выход 63,4%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для $C_{154}H_{166}N_{32}O_{12}$, *масса/заряд* 2655,34, результат составил 886,6 (M/3)⁺.

[00436] **Соединение 5**



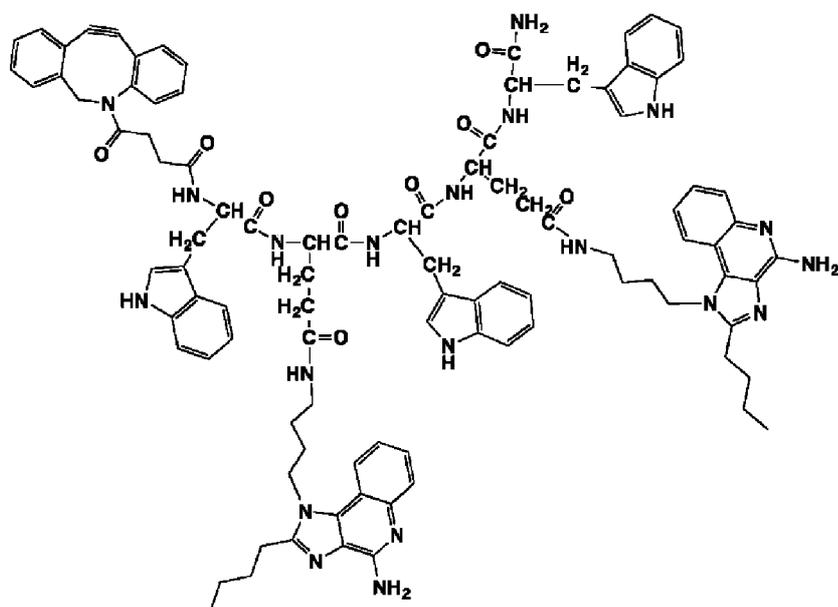
[00437] **Соединение 5**, именуемое как DBCO-2B₅, 2B₅ или DBCO-(Glu(2B)₅), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-(Glu)₅-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 5** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 33-45% ацетонитрил/H₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50x100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение ~ 10,0 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 25,2 мг (выход 62,6%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для $C_{134}H_{166}N_{32}O_{12}$, *масса/заряд* 2415,34, результат составил 1209,3 (M/2)⁺.

[00438] **Соединение 6**



[00439] **Соединение 6**, именуемое как DBCO-2B₃W₂, 2B₃W₂ или DBCO-(Glu(2B)₃(Trp)₂), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-Glu-Trp-Glu-Trp-Glu-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 6** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 33-47% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50x100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение ~ 8 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 197 мг (выход 50,6%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₁₀H₁₂₆N₂₄O₁₀, масса/заряд 1943,01, результат составил 973,0 (M/2)⁺.

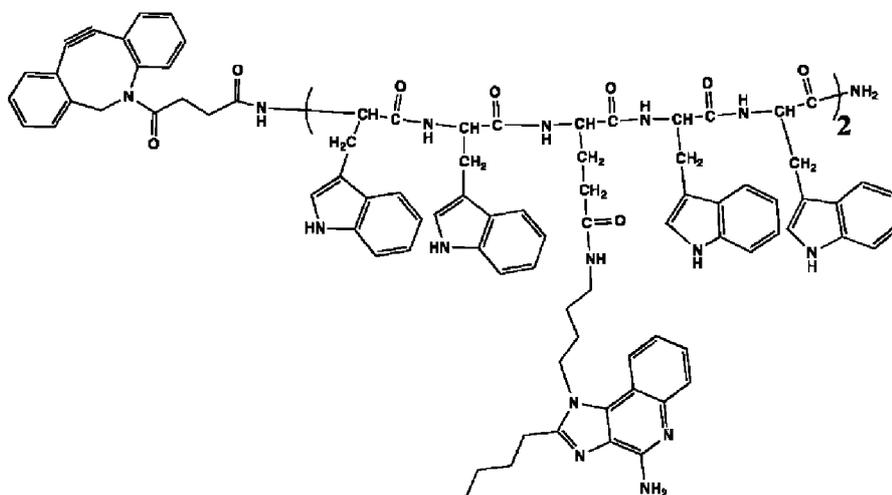
[00440] **Соединение 7**



[00441] **Соединение 7**, именуемое как DBCO-2B₂W₃, 2B₂W₃ или DBCO-(Glu(2B)₂(Trp)₃), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-Trp-Glu-Trp-Glu-Trp-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 7** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 35-65% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50x100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение ~ 9 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 11,6 мг (выход 62,5%)

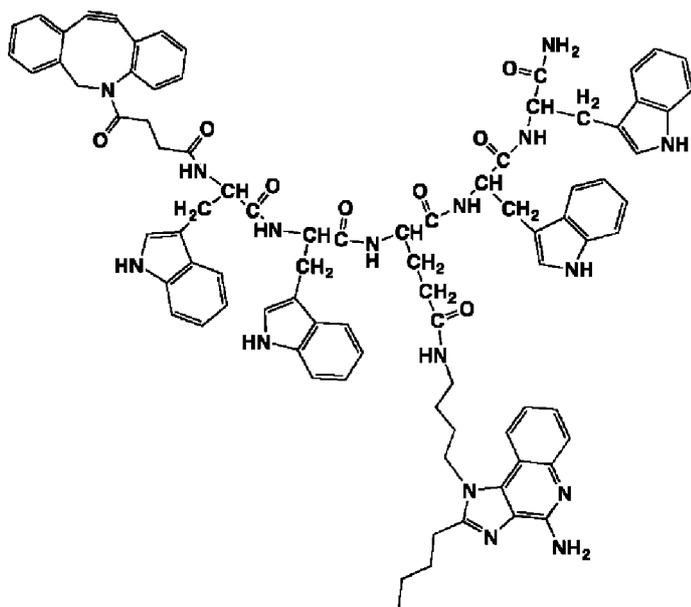
спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₉₈H₁₀₆N₂₀O₉, *масса/заряд* 1706,85, результат составил 854,9 (M/2)⁺.

[00442] **Соединение 8**



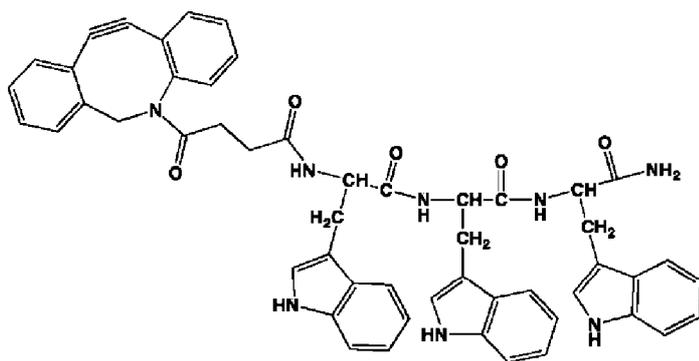
[00443] **Соединение 8**, именуемое как DBCO-2B₂W₈, 2B₂W₈ или DBCO-(Glu(2B)₂(Trp)₈), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-Trp-Trp-Glu-Trp-Trp-Trp-Trp-Glu-Trp-Trp-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 8** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 35-85% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение ~ 8,0 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 3,3 мг (выход 16,3%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₅₃H₁₅₆N₃₀O₁₄, *масса/заряд* 2637,24, результат составил 1320,2 (M/2)⁺.

[00444] **Соединение 9**



[00445] **Соединение 9**, именуемое как DBCO-2B₁W₄, 2B₁W₄ или DBCO-(Glu(2B))₁(Trp)₄, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-Trp-Trp-Glu-Trp-Trp-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 9** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 50-55% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 8,9 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 9,7 мг (выход 55,4%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₈₆H₈₆N₁₆O₈, *масса/заряд* 1470,68, результат составил 736,6 (M/2)⁺.

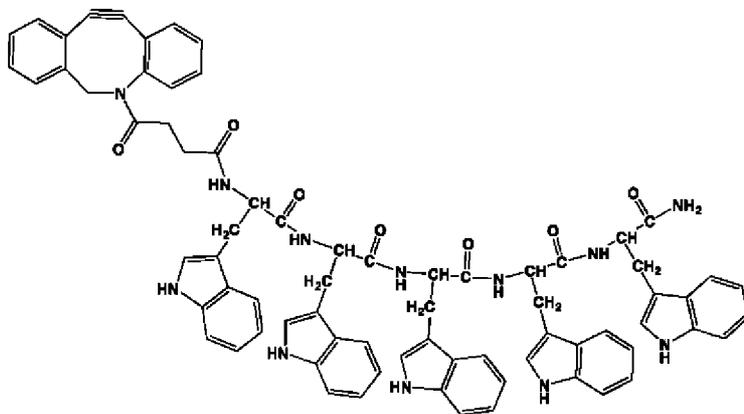
[00446] **Соединение 10**



[00447] **Соединение 10**, именуемое как DBCO-W₃, W₃ или DBCO-(Trp)₃, синтезировали путем введения в реакцию с 50,2 мг (0,08 ммоль, 1 экв.) предшественника трипептида NH₂-(Trp)₃-NH₂, который получали твердофазным пептидным синтезом с 35 мг DBCO-NHS (0,096 ммоль, 1,1 экв.) и 44 мг триэтиламина (0,44 ммоль, 5 экв.) в 1,5 мл DMSO. **Соединение 10** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением

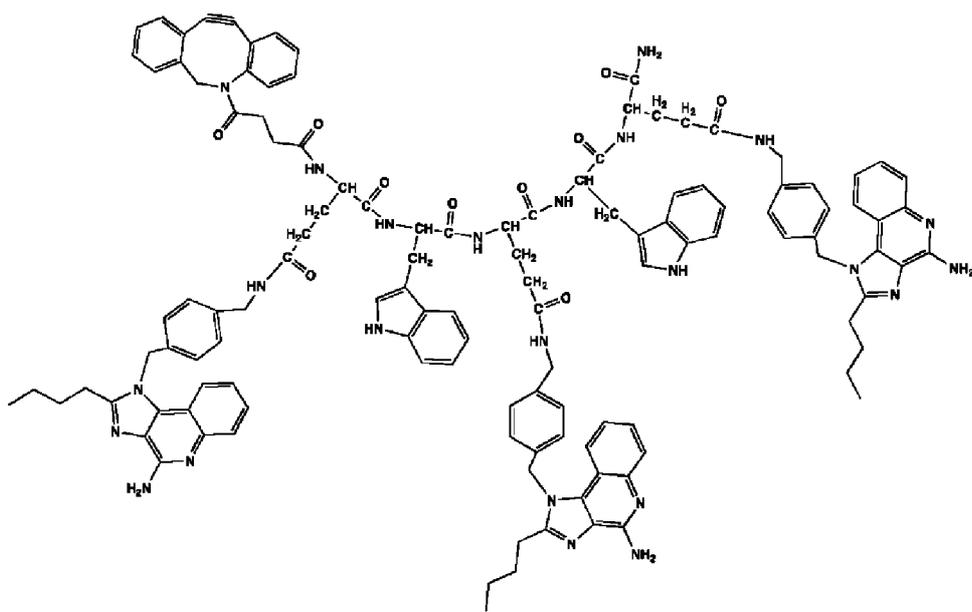
градиента 30-95% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50x100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение ~ 9 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 31,2 мг (выход 41,5%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка.

[00448] **Соединение 11**



[00449] **Соединение 11**, именуемое как DBCO-W₅, W₅ или DBCO-(Trp)₅, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 10**, за исключением того факта, что NH₂-(Trp)₅-NH₂ (SEQ ID NO: 70) применяли в качестве предшественника пептида для конъюгации с DBCO-NHS. **Соединение 11** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-95% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50x100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение ~ 10 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 28,7 мг (выход 44,1%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₇₄H₆₆N₁₂O₇, масса/заряд 1234,52, результат составил 1235,6 (M+H)⁺.

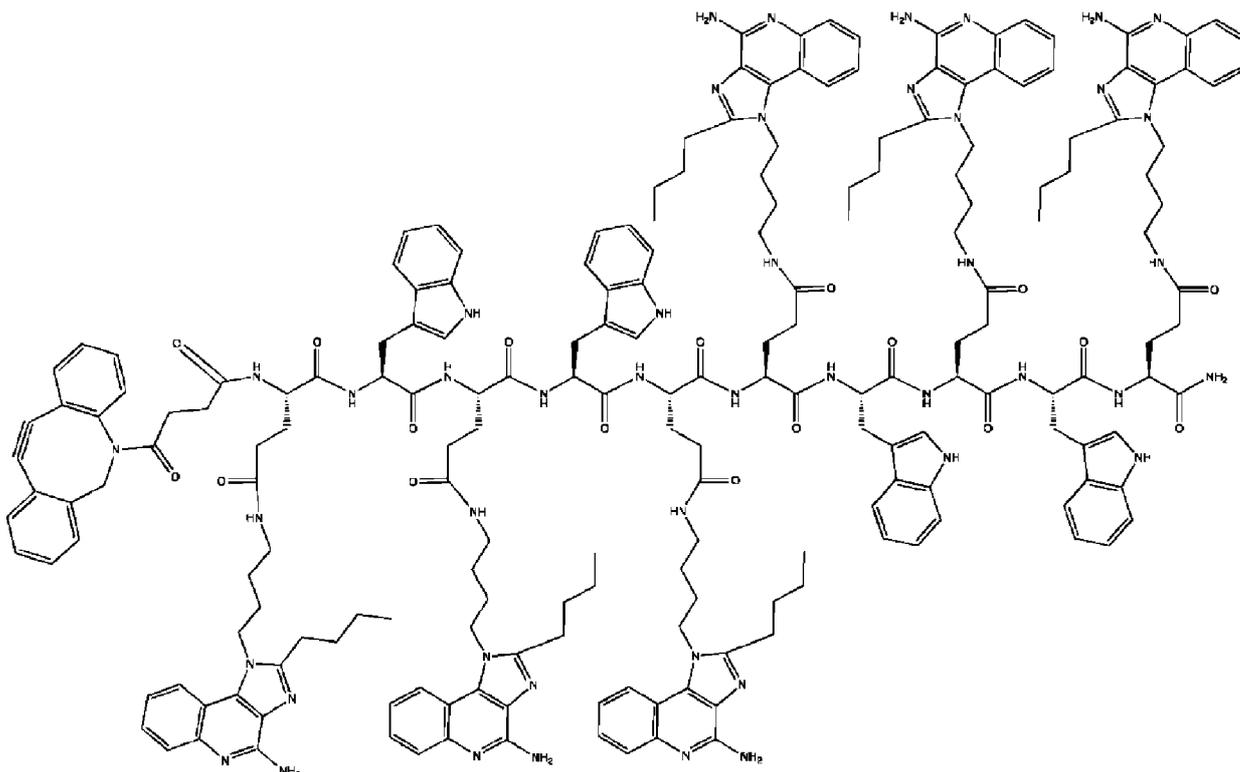
[00450] **Соединение 12**



[00451] **Соединение 12**, именуемое как DBCO-2BХу₃W₂, 2BХу₃W₂ или DBCO-(Glu(2BХу)₃(Trp)₂), получали с применением Fmoc-Glu-Trp-Glu-Trp-Glu-NH₂ и **Соединения 2** в качестве исходных материалов. 500 мг Fmoc-Glu-Trp-Glu-Trp-Glu-NH₂ (0,5 ммоль, 1 экв.), 595,6 мг тиазолин-2-тиола (ТТ) (5 ммоль, 10 экв.), 575,7 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) (3 ммоль, 6 экв.) суспендировали в 26 мл DCM. Добавляли 18,3 мг 4-(диметиламино)пиридина (DMAP) (0,2 ммоль, 0,3 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью аналитической ВЭЖХ. Через 4 часа добавляли еще четыре эквивалента ТТ и два эквивалента EDC. После встряхивания в течение ночи, добавляли два эквивалента ТТ и половину эквивалента EDC. Через 6 часов реакцию завершили. DCM удаляли в вакууме и твердое вещество помещали в 6 мл сухого DMSO. Добавляли 539,3 **Соединения 2** (1,5 ммоль, 3 экв.), и реакционную смесь встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем конъюгированное промежуточное соединение осаждали из 300 мл 1 молярного раствора HCl и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° С в течение 10 минут. Пеллет собирали и снова промывали 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Конечный собранный пеллет замораживали и высушивали в вакууме. 809,06 мг Fmoc-2BХу₃W₂-NH₂ (0,4 ммоль, 1 экв.) растворяли в 4 мл 20% пиперидина в DMF. Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем промежуточное соединение со снятой защитой осаждали из 100 мл эфира и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° С в течение 10 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем дважды промывали эфиром, после чего высушивали в вакууме с выходом промежуточного соединения. 729 мг NH₂-2BХу₃W₂-NH₂ (0,4 ммоль, 1 экв.) растворяли в 6

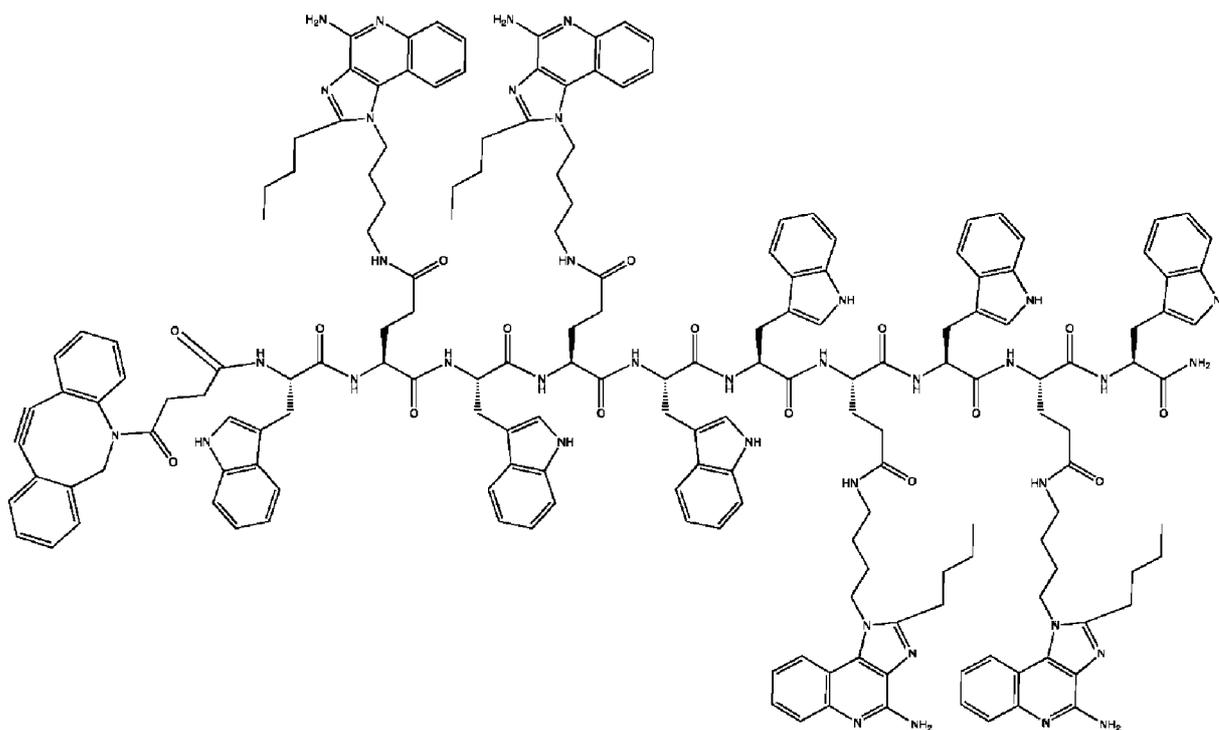
мл сухого DMSO. Добавляли 488,8 мг DBCO-NHS (1,2 ммоль, 3 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученный продукт очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 36-46% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением 239 мг (выход 38,1%) спектроскопически чистого белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₂₂H₁₂₆N₂₄O₁₀, *масса/заряд* 2087,65, результат составил 697 (M/3)⁺.

[00452] **Соединение 13**



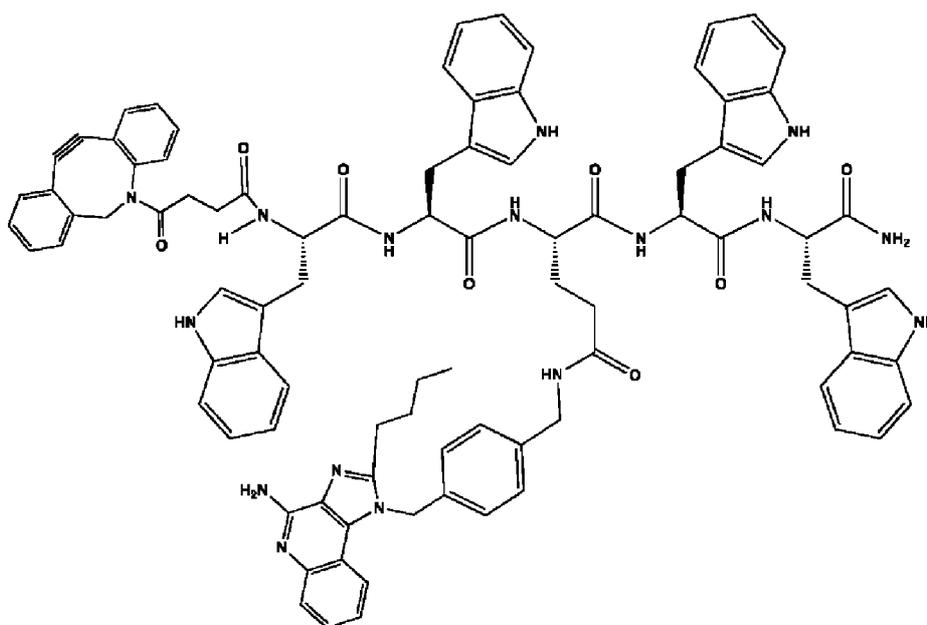
[00453] **Соединение 13**, именуемое как DBCO-2B₆W₄, 2B₆W₄ или DBCO-(Glu(2B))₆(Trp)₄, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-(Glu-Trp-Glu-Trp-Glu)₂-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 13** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 24-45% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₂₀₁H₂₃₆N₄₆O₁₈, *масса/заряд* 3582,4, результат составил 717,7 (M/5)⁺.

[00454] **Соединение 14**



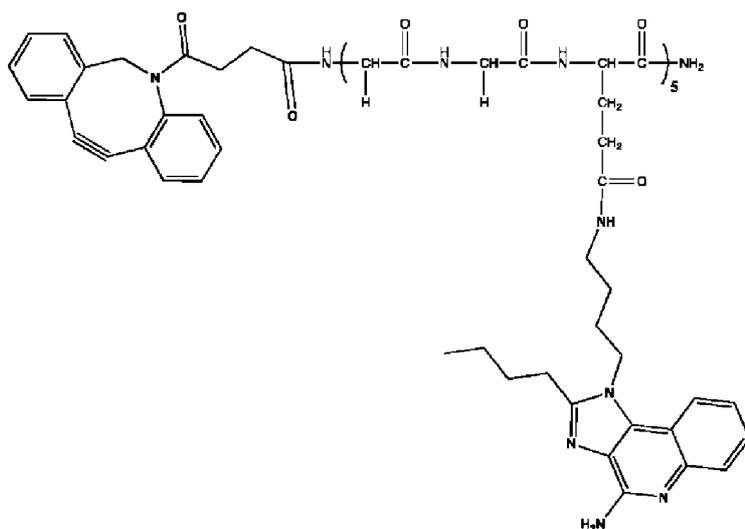
[00455] **Соединение 14**, именуемое как DBCO-2B₄W₆, 2B₄W₆ или DBCO-(Glu(2B)₄(Trp)₆), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-(Trp-Glu-Trp-Glu-Trp)₂-NH₂ применяли в качестве исходного материала для конъюгации **Соединения 1**. **Соединение 14** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 24-45% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₇₇H₁₉₆N₃₈O₁₆, *масса/заряд* 3111,7, результат составил 777,5 (M/4)⁺.

[00456] **Соединение 15**



[00457] **Соединение 15**, именуемое как DBCO-2BXy₁W₄, 2BXy₁W₄ или DBCO-(Glu(2BXy)₁(Trp)₄), получали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-Trp-Trp-Glu-Trp-Trp-NH₂ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 15** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 40-70% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 16 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 3,4 мг (выход 73,3%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₉₀H₈₅N₁₅O₉, *масса/заряд* 1519,67, результат составил 760,5 (M/2)⁺.

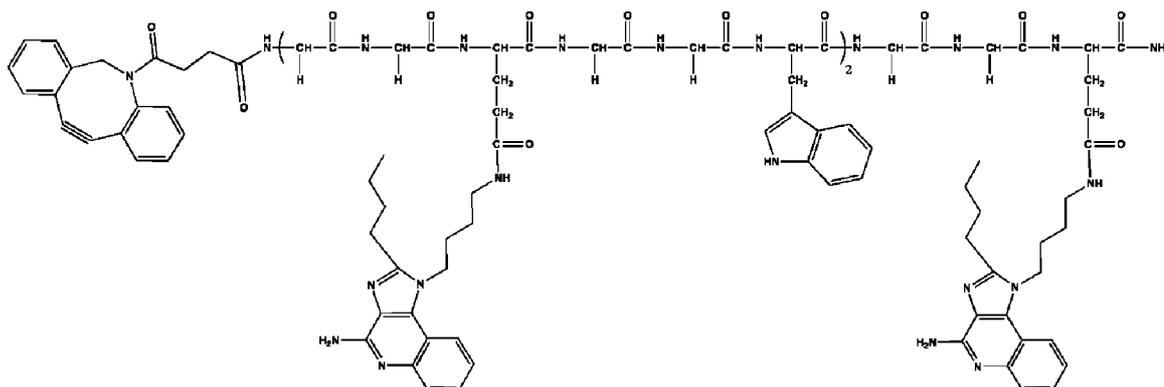
[00458] **Соединение 16**



[00459] **Соединение 16**, именуемое как DBCO-(GG2B)₅, 2B₅G₁₀ или DBCO-(Glu(2B)₅(Gly)₁₀), синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 3**, за исключением того факта, что Fmoc-(Gly-Gly-Glu)₅-NH₂ и **Соединение 1**

применяли в качестве исходных материалов. **Соединение 16** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 22-42% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30x100mm, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 7 минут, и полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 22,8 мг (выход 36,2%) спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₅₄H₁₉₆N₄₂O₂₂, *масса/заряд* 2985,51, результат составил 598,5 (M/5)⁺.

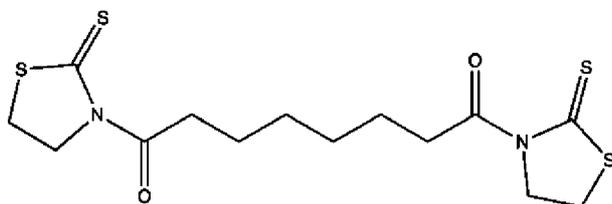
[00460] **Соединение 17**



[00461] **Соединение 17**, именуемое как DBCO-(GG2BGGW)₂GG2B, 2B₃W₂G₁₀ или DBCO-(Glu(2B)₃(Trp)₂(Gly)₁₀), синтезировали из предшественника Fmoc-(Gly-Gly-Glu-Gly-Gly-Trp)₂-Gly₂-Glu-NH₂, полученного твердофазным пептидным синтезом, и **Соединения 1**. 235,4 мг Fmoc-(Gly-Gly-Glu-Gly-Gly-Trp)₂-Gly₂-Glu-NH₂ (0,15 ммоль, 1 экв.) растворяли в 2 мл 20% пиперидина в DMF. Через 30 минут реакцию завершили, и продукт осаждали из 100 мл эфира и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° C в течение 10 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем дважды промывали эфиром, после чего высушивали в вакууме с выходом ~ 200 мг промежуточного соединения со снятой защитой. 200 мг (0,15 ммоль, 1 экв.) NH₂-(Gly-Gly-Glu-Gly-Gly-Trp)₂-Gly₂-Glu-NH₂ растворяли в 2 мл сухого DMSO, и добавляли 89,73 мг DBCO-NHS (0,22 ммоль, 1,5 экв.), после чего добавляли TEA (0,22 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученное промежуточное соединение DBCO очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-50% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением промежуточного соединения. 25 мг DBCO-(Gly-Gly-Glu-Gly-Gly-Trp)₂-Gly₂-Glu-NH₂ (0,015 ммоль, 1 экв.) и 17,11 мг **Соединения 1** (0,055 ммоль, 3,6 экв.) растворяли в 1,2 мл. сухого DMSO. Добавляли TEA (0,183 ммоль, 12 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в

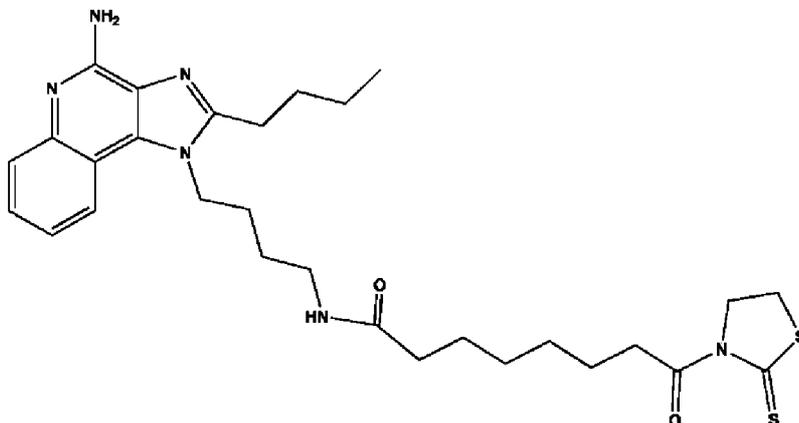
течение 5 минут. Добавляли 19,17 мг НАТУ (0,05 ммоль, 3,3 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS). Через 1 час добавляли 1,2 дополнительных эквивалента **Соединения 1** и 1,1 эквивалента НАТУ. Через 2 часа реакцию завершили. Полученный продукт очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-60% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением спектроскопически чистого белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₃₀H₁₅₆N₃₄O₂₀, *масса/заряд* 2515,96, результат составил 839 (m/3)⁺.

[00462] **Соединение 18**



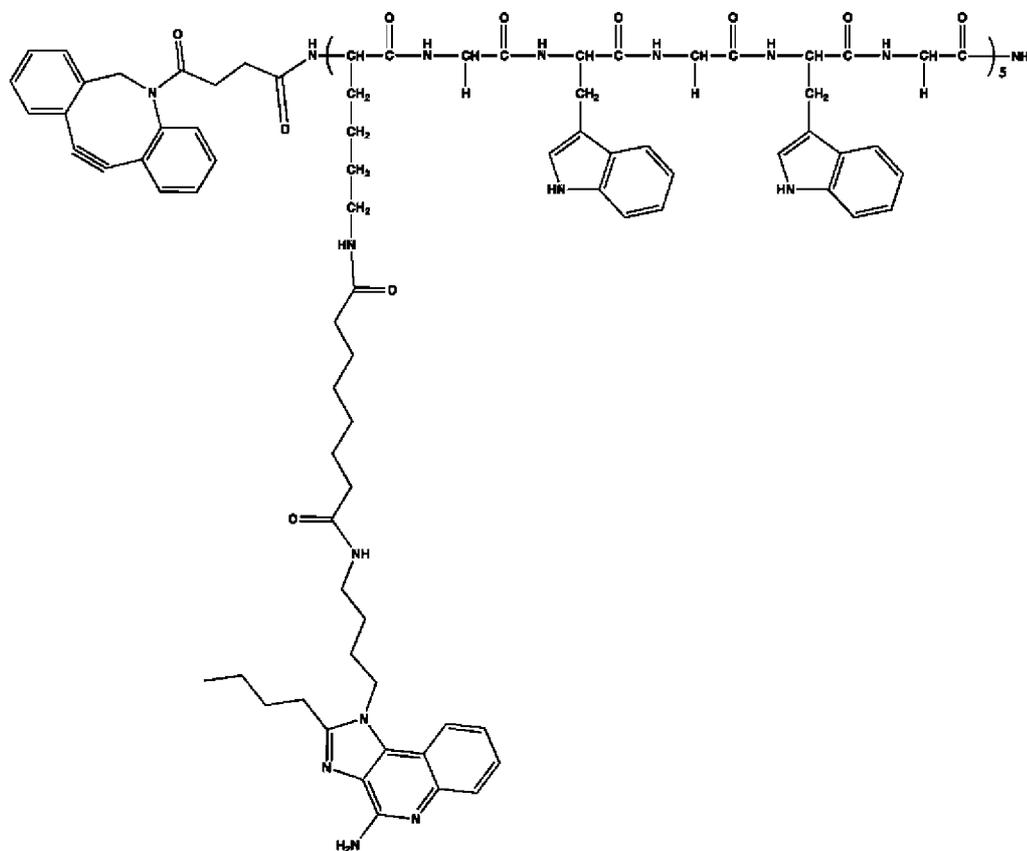
[00463] **Соединение 18**, именуемое как Bis(ТТ), синтезировали с применением субериновой кислоты и 2-тиазолин-2-тиола (ТТ) в качестве исходных материалов. Если выразить кратко, то 500 мг субериновой кислоты (2,87 ммоль, 1 экв.), 752,7 мг ТТ (6,31 ммоль, 2,2 экв.) и 1,431 г EDC (7,46 ммоль, 2,6 экв.) растворяли в 17,5 мл сухого DMSO. Добавляли 70,15 мг DMAP (0,57 ммоль, 0.2 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляли DCM и дважды промывали 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органические фракции высушивали сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества с количественным выходом.

[00464] **Соединение 19**



[00465] **Соединение 19**, именуемое как 2В-ТТ, синтезировали с применением **Соединения 18** и **Соединения 1** в качестве исходных материалов. Если выразить кратко, то 50 мг (0,16 ммоль, 1 экв.) **Соединения 1** растворяли в 0,6 мл метанола и добавляли по каплям к энергично встряхиваемому раствору, содержащему 301,1 мг **Соединения 18** (0,8 ммоль, 5 экв.), в 1,93 мл DCM. Через 30 минут, реакционную смесь впрыскивали непосредственно в колонку и очищали флэш-хроматографией с применением 2-ступенчатого градиента: 5% метанол в DCM в 5 объемах колонки (CV), затем 5-50% метанол в DCM-градиенте в 20 CV. Фракции объединяли и растворитель удаляли в вакууме. MS (ESI) рассчитывали для $C_{29}H_{40}N_6O_2S_2$, *масса/заряд* 568,27, результат составил 569,3 (m+H)⁺.

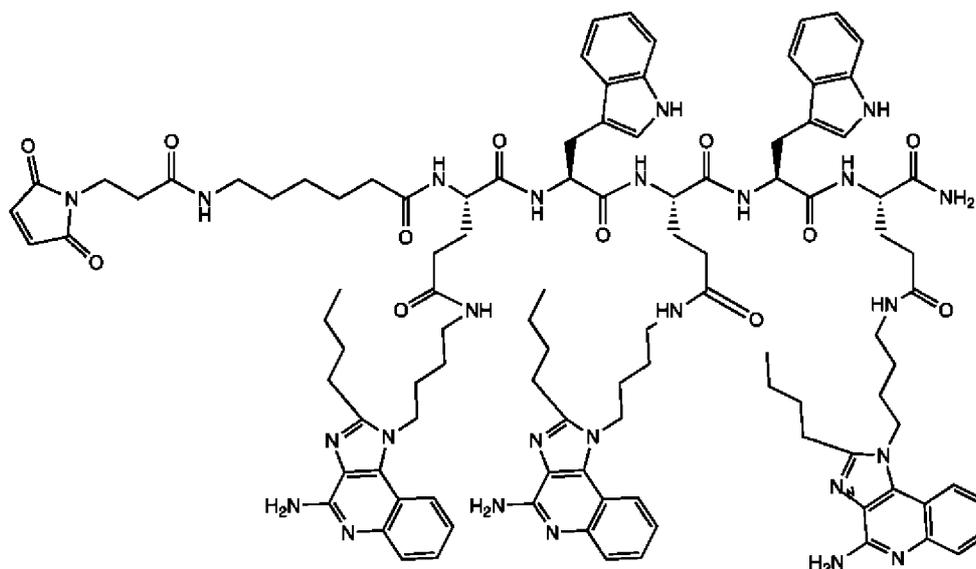
[00466] **Соединение 20**



[00467] **Соединение 20**, именуемое как DBCO-(2BGWGWG)₅, 2B₅W₁₀G₁₅ или DBCO-(Glu(2B)₅(Trp)₁₀(Gly)₁₅), синтезировали из пептидного предшественника Fmoc-(Lys-Gly-Trp-Gly-Trp-Gly)₅-NH₂, который получали твердофазным пептидным синтезом, и **Соединения 19**. 49,8 мг (0,01 ммоль, 1 экв.) Fmoc-(Lys-Gly-Trp-Gly-Trp-Gly)₅-NH₂ растворяли в 0,5 мл сухого DMSO. К этому раствору добавляли 0,492 мл **Соединения 19** (0,03 ммоль, 2,5 экв.) в виде 40 мг/мл базового раствора в сухом DMSO. Добавляли TEA (0,01 ммоль, 1 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в

течение 4 часов. Аналитическая ВЭЖХ с применением градиента 45-65% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут показала полное преобразование в пентазамещенное промежуточное соединение. Реакцию гасили добавлением amino-2-пропанола (0,03 ммоль, 2,5 экв.), а затем добавляли 0,5 мл 20% пиперидина в DMF, и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакционную смесь добавляли к 50 мл эфира и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° C в течение 10 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем дважды промывали эфиром, после чего высушивали в вакууме с выходом промежуточного соединения со снятой защитой. 73,4 мг промежуточного соединения со снятой защитой (0,0131 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл сухого DMSO, после чего добавляли 0,066 мл (0,0196 ммоль, 1,5 экв.) DBCO-NHS (40 мг/мл) и TEA (0,0131 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре и затем гасили добавлением amino-2-пропанола (0,0196 ммоль, 1,5 экв.). Затем продукт осаждали из 50 мл 1 молярного раствора HCl и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° C в течение 10 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем снова промывали 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Конечный собранный пеллет высушивали в вакууме с выходом 15,1 мг (выход 26%) конечного продукта. MS (ESI) рассчитывали для C₃₁₉H₃₉₆N₇₂O₄₂ масса/заряд 5909,1, результат составил 1183 (m/5)⁺.

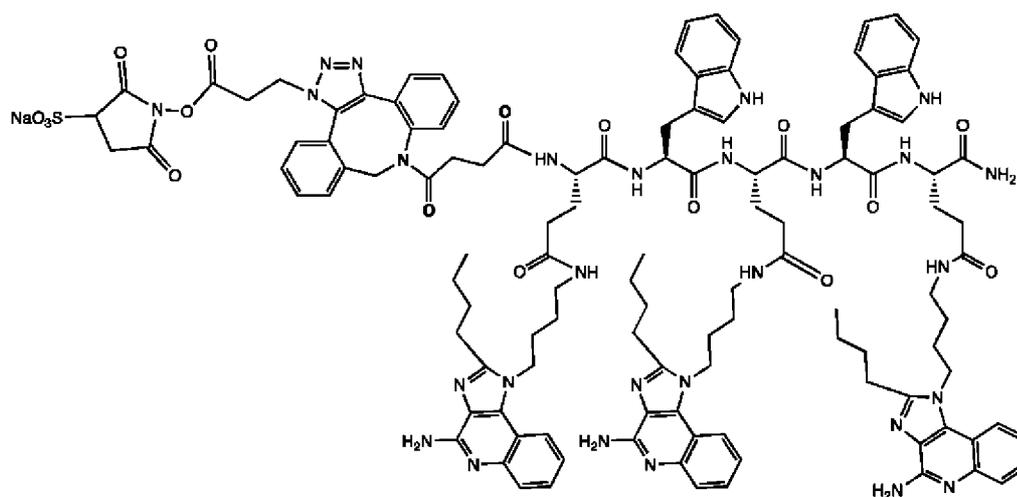
[00468] **Соединение 21**



[00469] **Соединение 21**, именуемое как Mal-2B₃W₂ или Mal-(Glu(2B)₃(Trp)₂), синтезировали, начиная с Fmoc-(Glu)₃(Trp)₂-NH₂ и **Соединения 1**. 100 мг Fmoc-(Glu)₃(Trp)₂-NH₂ (0,1 ммоль, 1 экв.) и 112,1 мг **Соединения 1** (0,36 ммоль, 3,6 экв.) растворяли в 8 мл сухого DMF. Добавляли TEA (1,2 ммоль, 12 экв.), и раствор охлаждали

на ледяной бане при встряхивании в течение 5 минут. Добавляли NHTU (0,33 ммоль, 3,3 экв.), и реакционную смесь встряхивали при температуре 4° С в течение 1 часа. Затем реакционную смесь добавляли к 50 мл 1 молярного раствора HCl и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° С в течение 10 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем снова промывали 1 молярным раствором HCl и снова DI водой с получением конъюгированного промежуточного соединения. Затем 188 мг Fmoc-2B₃W₂-NH₂ (0,1 ммоль, 1 экв.) растворяли в 2 мл 20% пиперидина в растворе DMF и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Промежуточное соединение со снятой защитой осаждали из 100 мл эфира и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° С в течение 30 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем дважды промывали эфиром, после чего высушивали в вакууме с выходом промежуточного соединения со снятой защитой. 30 мг NH₂-2B₃W₂-NH₂ (0,018 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,3 мл сухого DMSO, после чего добавляли 22 мг сукцинимидил 6-((бета-малеимидопропионамидо)гексаноата (SMPH) (0,058 ммоль, 3,2 экв.). Реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре, и полученный продукт очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-50% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 4,75 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением 23 мг (выход 66,7%) спектроскопически чистого белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₀₄H₁₂₉N₂₅O₁₂, масса/заряд 1921,33, результат составил 961 (m/2)⁺.

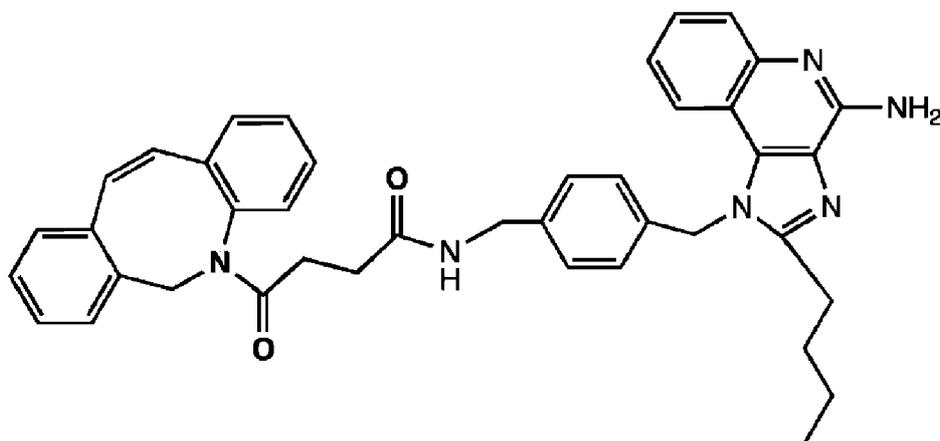
[00470] **Соединение 22**



[00471] **Соединение 22**, именуемое как NHS-2B₃W₂, синтезировали путем ведения в реакцию 125 мкг (0,0004 ммоль, 1 экв.) сульфо-NHS эфира 3-Азидопропионовой кислоты (Az-NHS, инструменты клик-химии) с 0,8 мг (0,0004 ммоль, 1 экв.) **Соединения 6**

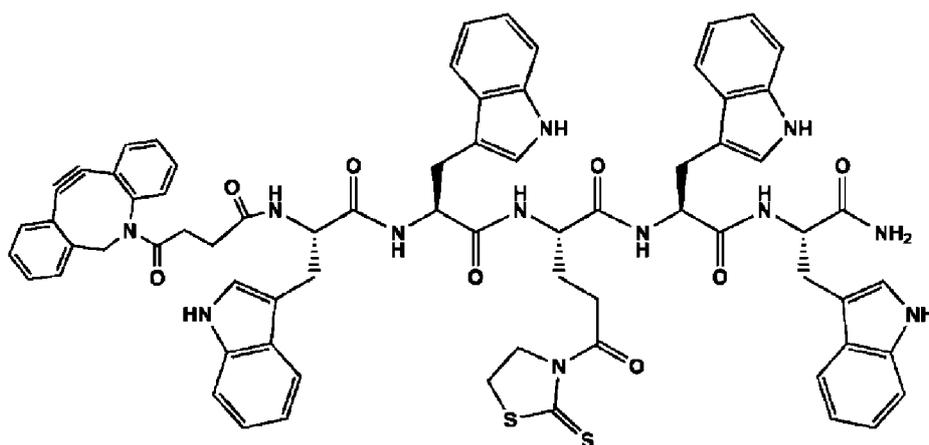
в сухом DMSO. ВЭЖХ показала полное преобразование в NHS-активированное соединение, которое применяли немедленно для конъюгации пептидов, несущих реакционно-способный амин. MS (ESI) рассчитывали для $C_{117}H_{133}N_{28}O_{17}S$, *масса/заряд* 2234, результат составил 1119 ($m/2$)⁺.

[00472] **Соединение 23**



[00473] **Соединение 23**, именуемое как DBCO-2ВХу, синтезировали путем введения в реакцию 5,0 мг (0,01 ммоль, 1 экв.) DBCO-NHS с 4,91 мг (0,011 ммоль, 1,1 экв.) **Соединения 2** в сухом DMSO. Раствор DMSO растворяли в этилацетате и затем промывали 1 молярным раствором HCl. Органический слой удаляли в вакууме с получением ~ 3 мг спектроскопически чистого белого твердого вещества. MS (ESI) рассчитывали для $C_{41}H_{40}N_6O_2$, *масса/заряд* 646,31, результат составил 647,3 ($m/2$)⁺.

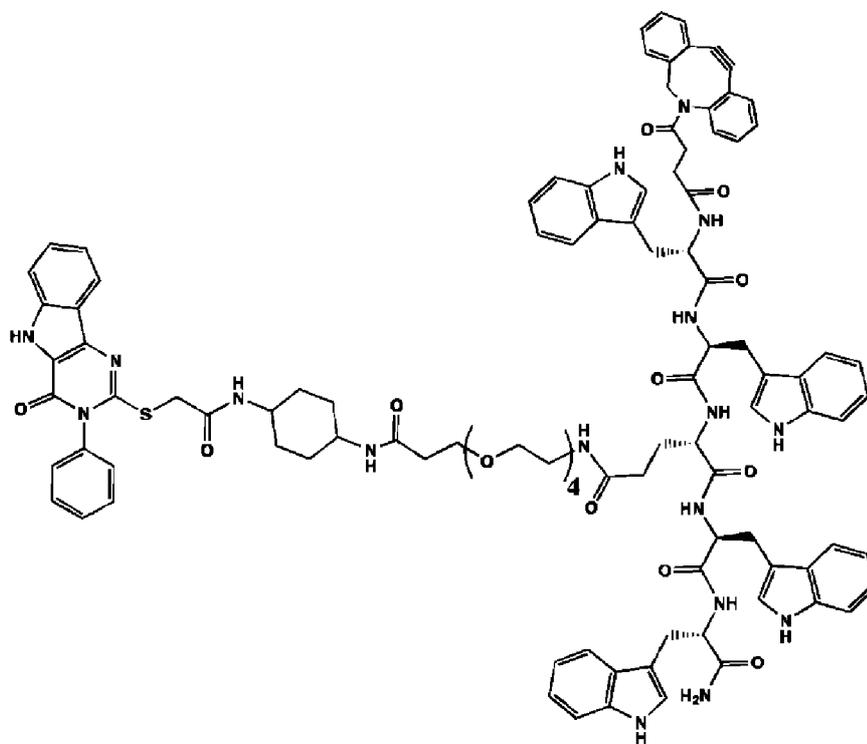
[00474] **Соединение 24**



[00475] **Соединение 24**, именуемое как DBCO-WWTTWW или W₄TT, получали с применением NH_2 -Trp-Trp-Glu-Trp-Trp- NH_2 , полученного твердофазным пептидным синтезом. 32,8 мг NH_2 -Trp-Trp-Glu-Trp-Trp- NH_2 (0,04 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл сухого DMSO и добавляли 15,5 мг (0,04 ммоль, 1 экв.) DBCO-NHS, после чего добавляли TEA (0,04 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученное промежуточное соединение DBCO очищали в препаративной

системе ВЭЖХ с применением градиента 40-70% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 16 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали. Для ТТ-активации DBCO-пептида, 6,1 мг DBCO-Trp-Trp-Glu-Trp-Trp-NH₂ (0,005 ммоль, 1 экв.), 0,68 мг ТТ (0,006 ммоль, 1,1 экв.) и 1,26 мг EDC (0,007 ммоль, 1,3 экв.) растворяли в 0,2 мл 1:1 раствора DMSO и DCM. В реакционную смесь добавляли 0,06 мг DMAP (0,001 ммоль, 0.1 экв.), энергично встряхивая при комнатной температуре. Через 2 часа добавляли дополнительные 3,3 эквивалента ТТ, 4,0 эквивалента EDC и 0,1 эквивалента DMAP, и реакция завершилась в общей сложности через 3 часа. DBCO-WWTTWW применяли в качестве промежуточного соединения на последующих этапах.

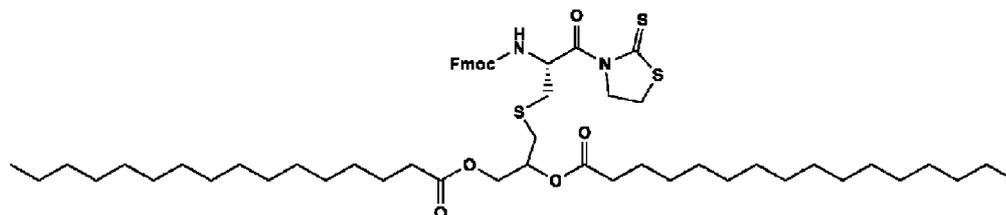
[00476] **Соединение 25**



[00477] **Соединение 25**, обозначаемое как DBCO-WWPIWW, WW(PI)WW или PIW₄. Примидо-индол-Peg₄-NH₂ (PI-NH₂, агонист TLR-4) получали, как описано ранее (Линн Г.М., *и др.*, Характеристика *in vivo* физико-химических свойств сцепленных с полимером агонистов TLR, которые усиливают иммуногенность вакцины. *Nat Biotechnol* 33(11): 1201-1210, 2015). К 3,6 мг PINH₂ (0,005 ммоль, 2 экв.) добавляли 3,31 мг **Соединения 33** (0,0026 ммоль, 1 экв.) и TEA (0,003 ммоль, 1,1 экв.) в DMSO, и встряхивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученный продукт очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 45-75% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 16 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные

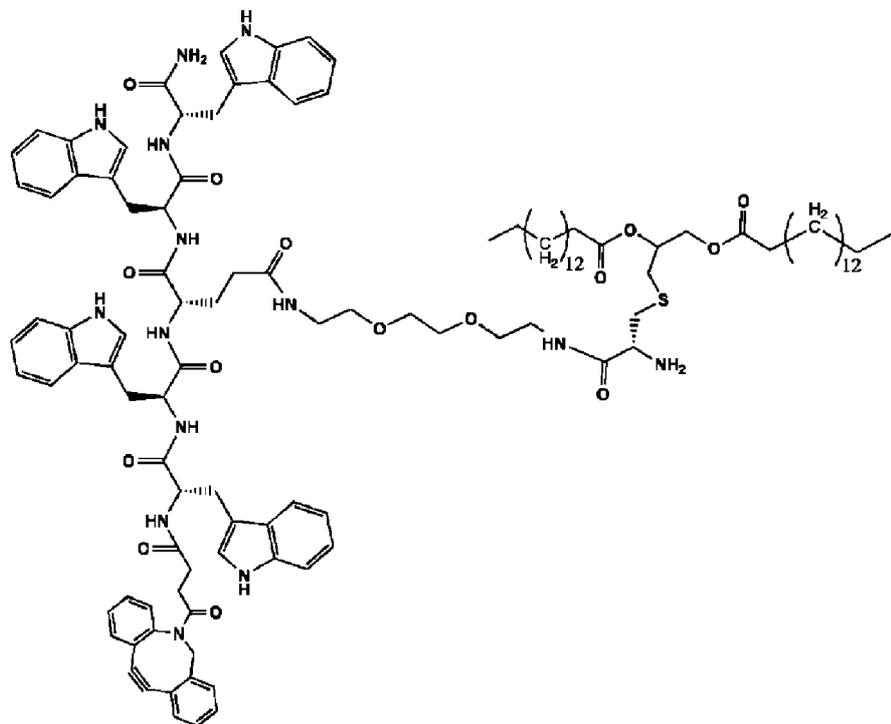
фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали. MS (ESI) рассчитывали для $C_{103}H_{107}N_{17}O_{15}S$, масса/заряд 1854,77, результат составил 928,6 (m/2)⁺.

[00478] **Соединение 26**



[00479] **Соединение 26**, именуемое как Pam2Cys-TT или P2C-TT, которое является агонистом TLR-2/6, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 24**, за исключением того факта, что Fmoc-Pam2Cys-Acid применяли в качестве исходного материала, а реакцию контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (TLC) (1% метанол в DCM). В результате процедуры продуцируется желтое твердое вещество с количественным выходом, которое применяли в качестве промежуточного соединения на последующих этапах реакции.

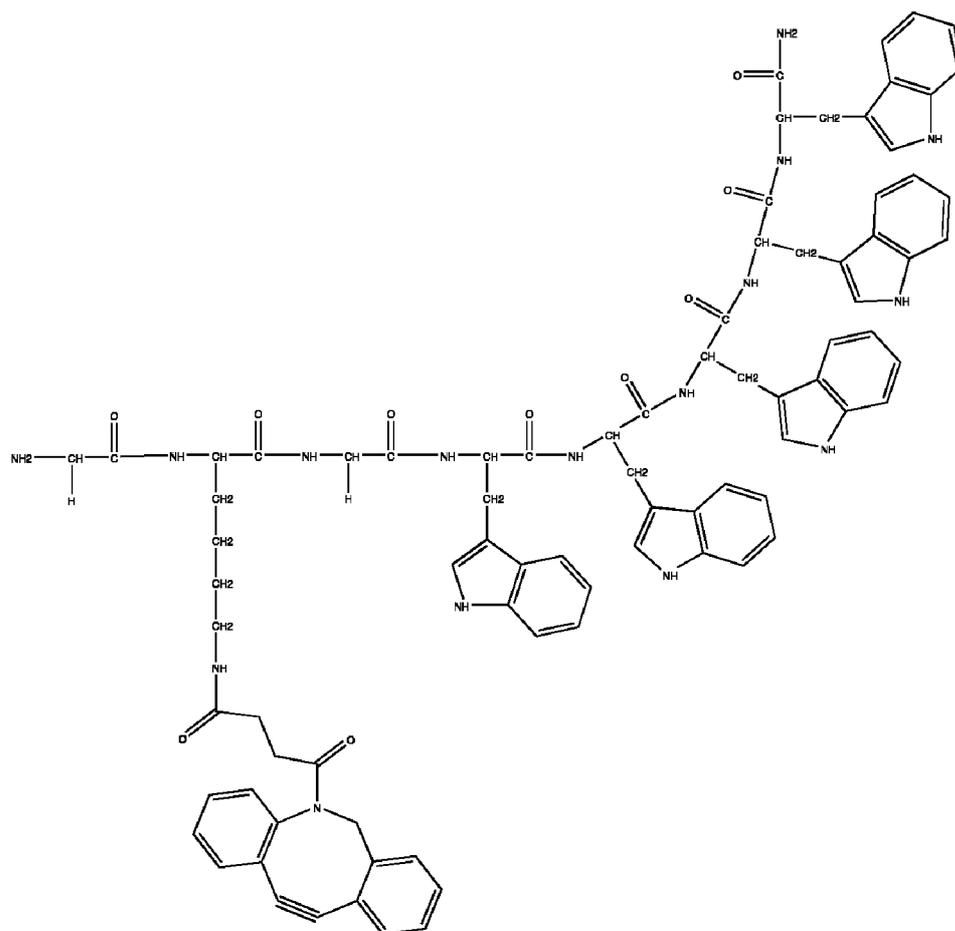
[00480] **Соединение 27**



[00481] **Соединение 27**, именуемое как DBCO-WWPam2CysWW, WW(P2C)WW или P2C(W)₄, получали с применением **Соединения 24**, PEG2-диамина и **Соединения 26** в качестве исходных материалов. Сначала, 1,15 мг PEG2-диамина (0,008 ммоль, 3 экв.) добавляли к реакционной смеси, содержащей 3,31 мг **Соединения 24** (0,0026 ммоль, 1 экв.), и реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре.

Реакционную смесь добавляли к 15 мл DI воды и центрифугировали. Пеллет собирали и дополнительно трижды промывали DI водой и лиофилизировали. Промежуточное соединение (DBCO-WWPeg2NH₂WW) помещали в 0,1 мл сухого DMSO, и 2,58 мг **Соединения 26** (0,0026 ммоль, 1 экв.) добавляли в виде базового раствора в концентрации 100 мг/мл в DCM. Реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре, и затем DCM удаляли в вакууме, после чего добавляли 0,2 мл 20% пиперидина в DMF. Реакционную смесь встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем разбавляли DCM и трижды промывали DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и упаривали. Полученное масло растворяли в DMSO и очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 70-100% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 16 минут на колонке Agilent Prep-C18, 9,4×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции объединяли и упаривали с получением продукта DBCO-WWPam2CysWW. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов **Соединения 27**.

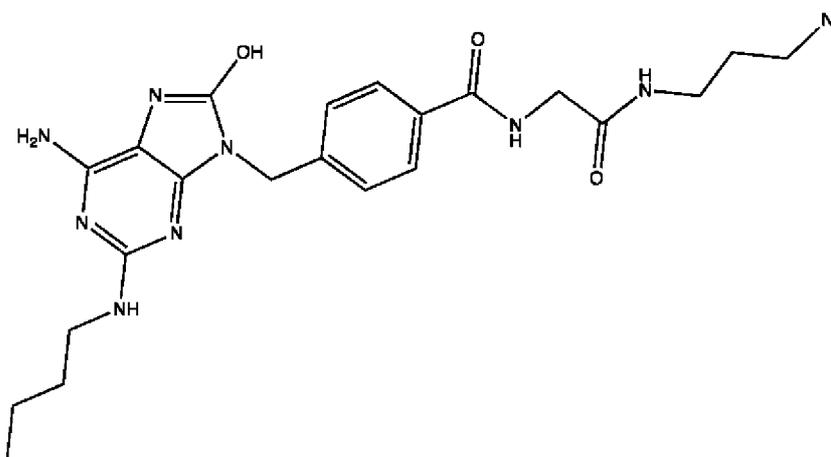
[00482] **Соединение 28**



[00483] **Соединение 28**, именуемое как NH₂-GK(DBCO)GW₅, синтезировали с применением Fmoc-Gly-Lys-Gly-(Trp)₅-NH₂, полученного твердофазным пептидным

синтезом, и DBCO-NHS в качестве исходных материалов. 50 мг Fmoc-Gly-Lys-Gly-(Trp)₅-NH₂ (0,04 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,25 мл сухого DMSO. Добавляли TEA (0,04 ммоль, 1 экв.), и раствор встряхивали при комнатной температуре в течение 5 минут. Добавляли 14,24 мг DBCO-NHS (0,04 ммоль, 1 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакцию гасили amino-2-пропанолом (0,04 ммоль, 1 экв.) и добавляли 0,5 мл 20% пиперидина в DMF. Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 30 часа. Затем продукт осаждали из 50 мл эфира и центрифугировали при ускорении 3000 g при температуре 4° C в течение 10 минут. Продукт собирали в виде твердого пеллета и затем дважды промывали эфиром, после чего высушивали в вакууме. Продукт очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 25-45% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 9,4 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением спектроскопически чистого грязно-белого твердого вещества. MS (ESI) рассчитывали для C₈₄H₈₄N₁₆O₁₀, *масса/заряд* 1477,64, результат составил 739,6 (m/2)⁺.

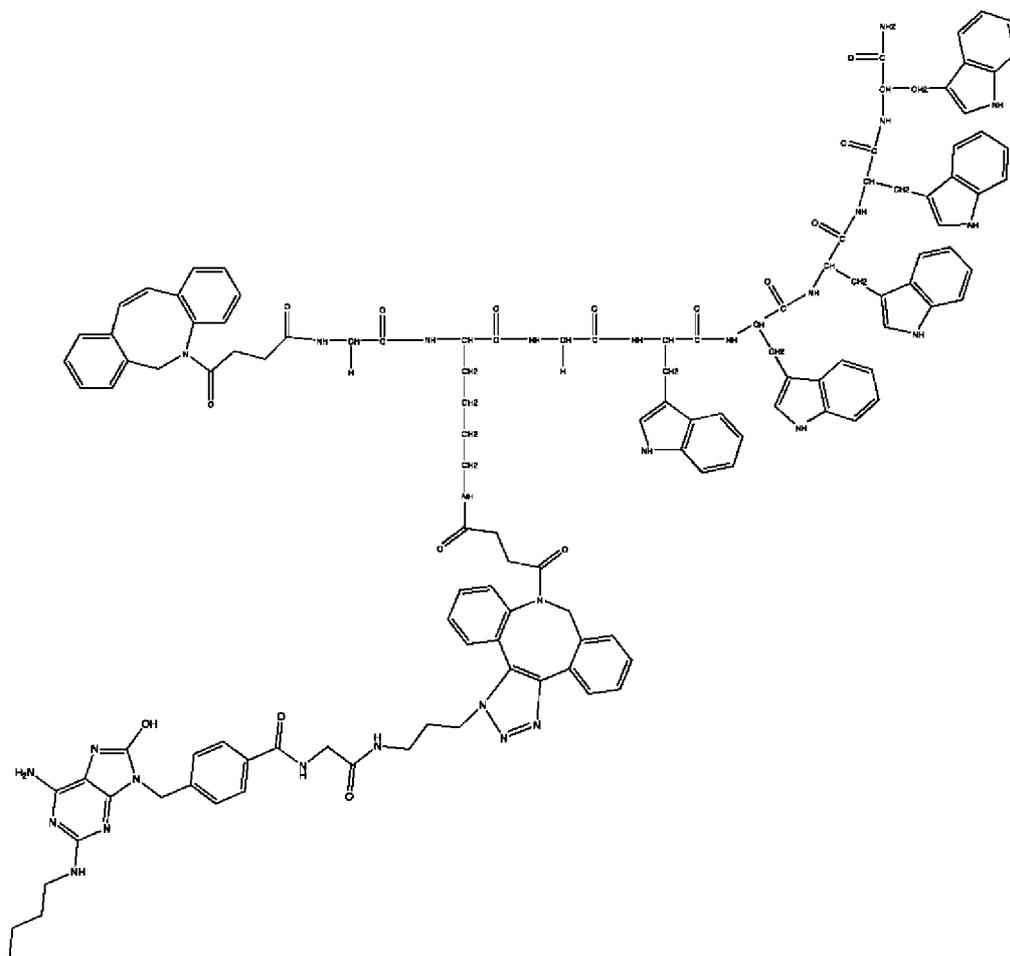
[00484] **Соединение 29**



[00485] **Соединение 29**, именуемое как CL264-Азид, гидроксиаденин-Азид или TLR-7-азид, который представляет собой агонист TLR-7, синтезировали с применением CL264 (Инвиводжен, Сан-Диего, Калифорния, США) и Азидо-пропиламина в качестве исходных материалов. 5 мг CL264 (0,012 ммоль, 1 экв.) и 6,1 мг Азидо-пропиламина (0,061 ммоль, 5 экв.) растворяли в сухом DMF. Добавляли TEA (0,073 ммоль, 6 экв.), и раствор охлаждали до 0° C на ледяной бане. Добавляли 27,6 мг НАТУ (0,073 ммоль, 6 экв.), и реакционную смесь встряхивали при температуре 0° C в течение 1 часа. **Соединение 29** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 20-40% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 5 минут, и полученные фракции

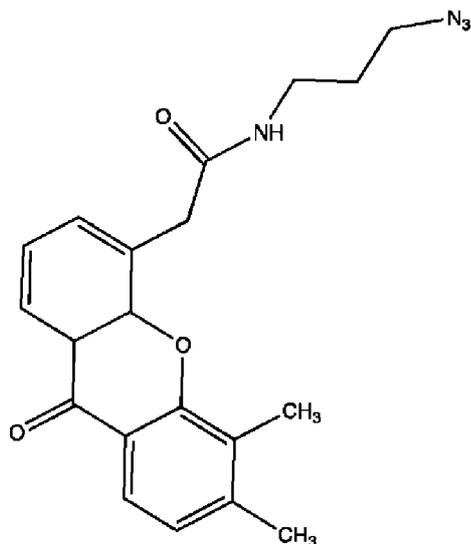
объединяли, замораживали и лиофилизировали. MS (ESI) рассчитывали для $C_{22}H_{29}N_{11}O_3$, *масса/заряд* 495,25, результат составил 496,3 ($m+H$)⁺.

[00486] **Соединение 30**



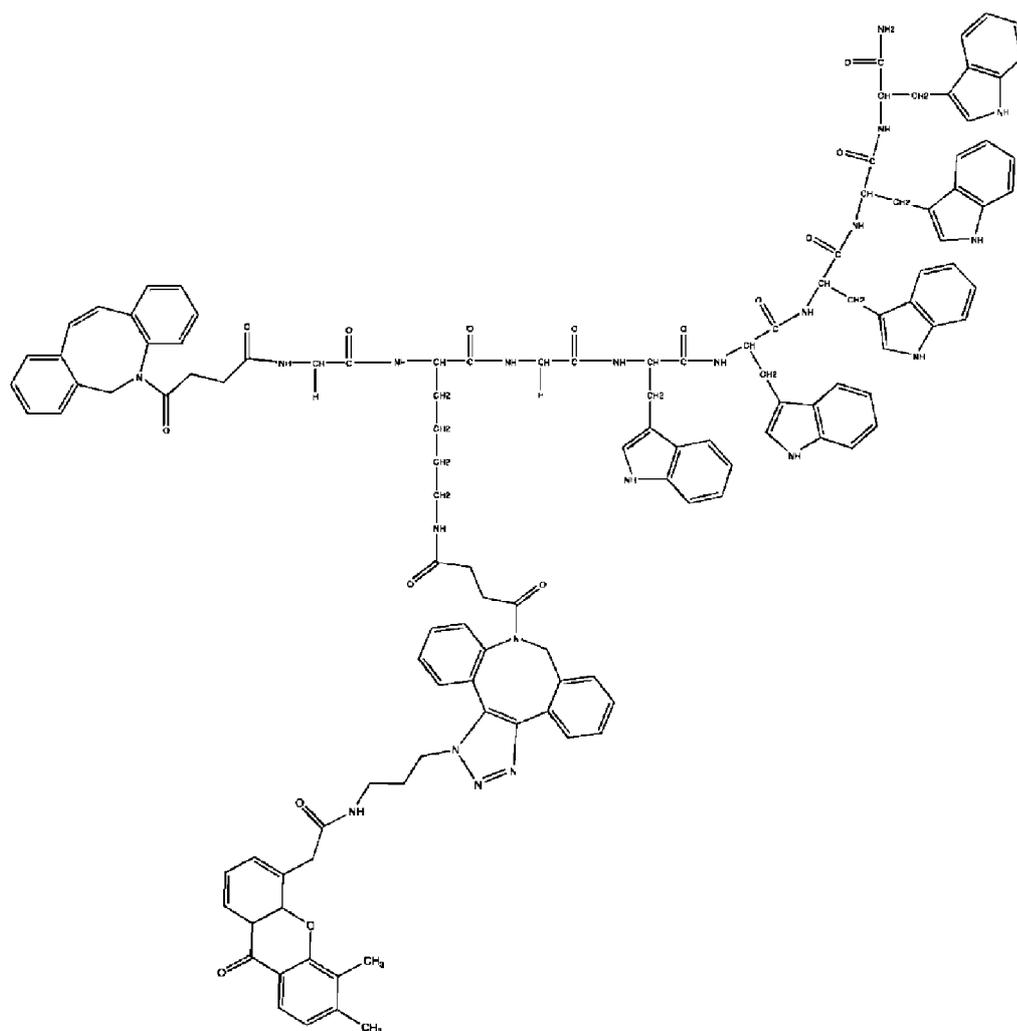
[00487] **Соединение 30**, именуемое как DBCO-GK(CL264)G-W₅, CL264-(W)₅ или DBCO-Gly-Lys(DBCO-CL264)-Gly-(Trp)₅-NH₂, синтезировали с применением **Соединения 28** и **29** в качестве исходных материалов. 5 мг **Соединения 28** (0,0034 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,25 мл сухого DMSO и добавляли 1,68 мг **Соединения 29** (0,0034 ммоль, 1 экв.), и реакцию смесь встряхивали в течение 2 часов, после чего добавляли 1,5 мг DBCO-NHS (0,0037 ммоль, 1,1 экв.) и 0,5 экв. TEA. Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре, и затем полученный продукт очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 25-55% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 9,4 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением спектроскопически чистого белого твердого вещества. MS (ESI) рассчитывали для $C_{125}H_{128}N_{28}O_{15}$, *масса/заряд* 2261,01, результат составил 1132,2 ($m/2$)⁺.

[00488] **Соединение 31**



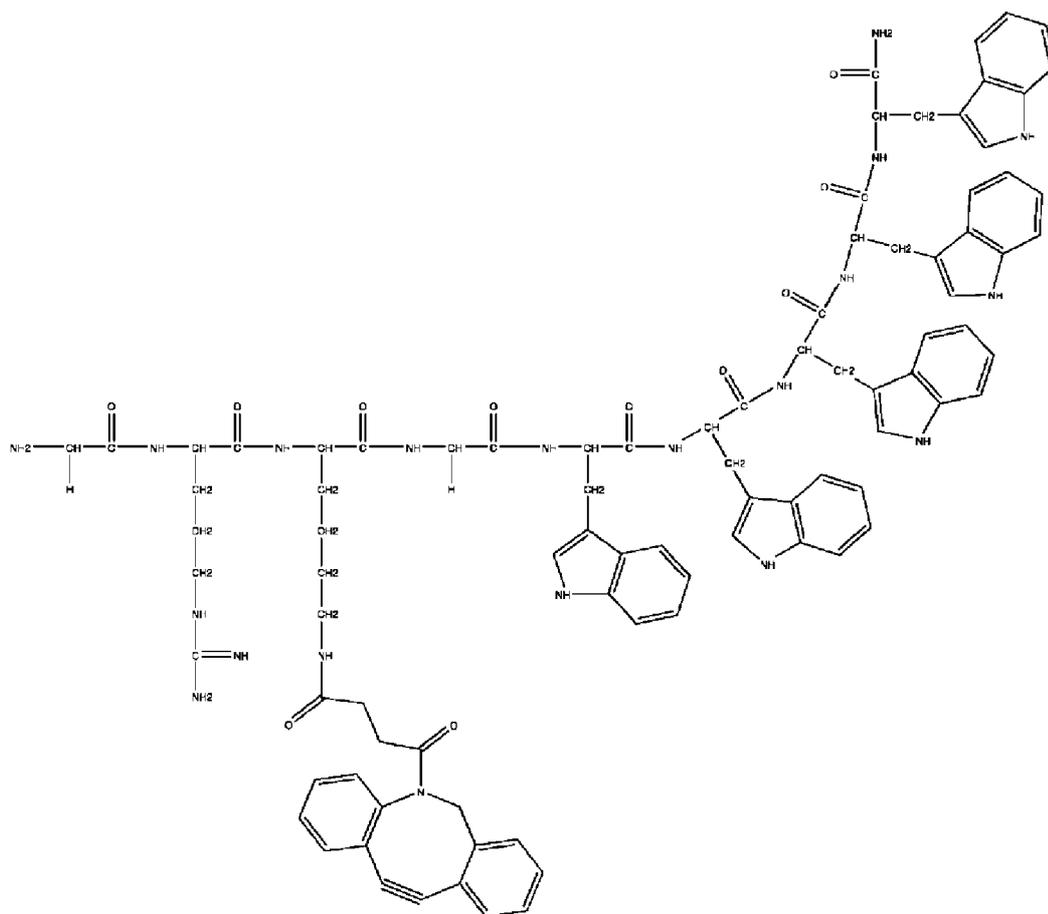
[00489] **Соединение 31**, именуемое как DMXAA-азид, который представляет собой агонист STING, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 29**, за исключением того факта, что DMXAA (Инвиводжен) применяли в качестве исходного. **Соединение 31** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 35-65% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 6 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением спектроскопически чистого белого твердого вещества. MS (ESI) рассчитывали для C₂₀H₂₂N₄O₃, *масса/заряд* 366,42, результат составил 365,2.

[00490] **Соединение 32**



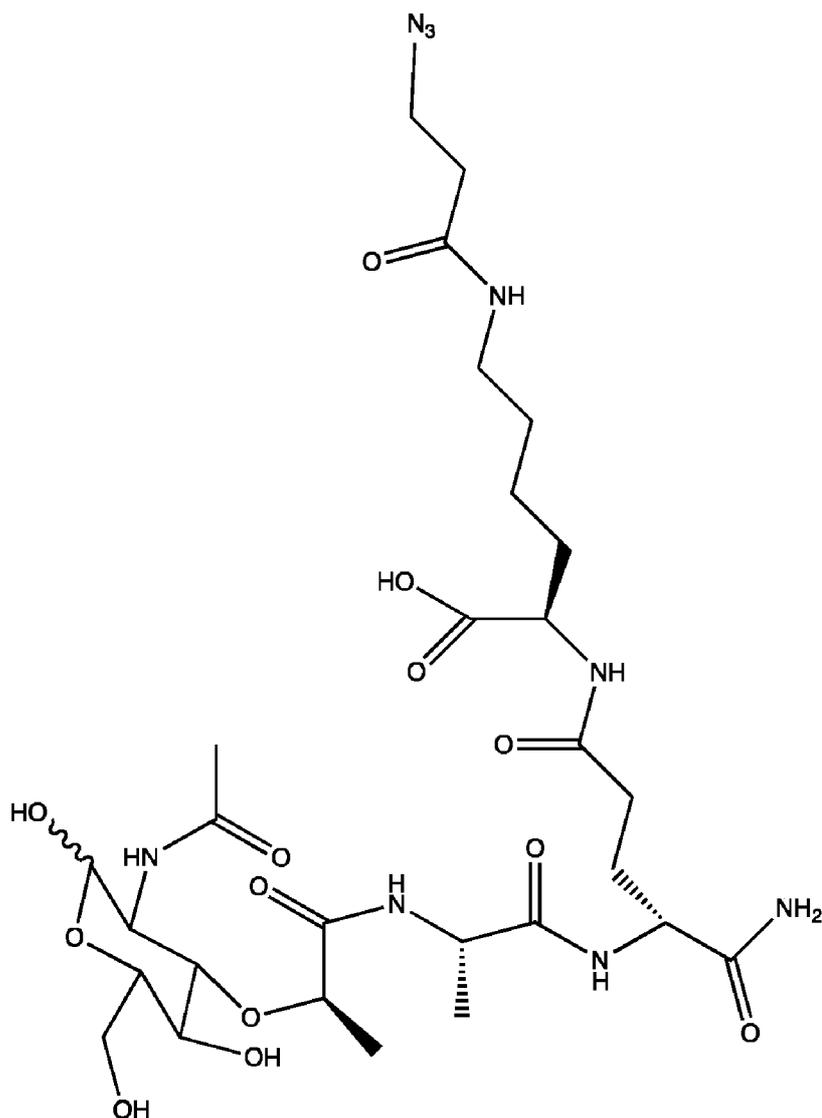
[00491] **Соединение 32**, именуемое как DBCO-GK (DMXAA)-G-W₅, DMXAA-(W)₅, DMXAA-W₅ или DBCO-Gly-Lys(DBCO-DMXAA)-Gly-(Trp)₅-NH₂, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 30**, за исключением того, факта что **Соединение 31** применяли в качестве агониста-груза. **Соединение 32** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 45-85% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. MS (ESI) рассчитывали для C₁₂₃H₁₂₁N₂₁O₁₅, *масса/заряд* 2131,94, результат составил 1067,6 (m/2)⁺.

[00492] **Соединение 33**



[00493] **Соединение 33**, именуемое как $\text{NH}_2\text{-GRK(DBCO)GW}_5$, $\text{NH}_2\text{-Gly-Arg-Lys(DBCO)-Gly-(Trp)}_5\text{-NH}_2$, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 28**, за исключением $\text{Fmoc-GRKGW}_5\text{-NH}_2$, который продуцировали твердофазным пептидным синтезом, и применяли в качестве исходного материала. **Соединение 33** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 25-55% ацетонитрил/ H_2O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 7.5 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали. MS (ESI) рассчитывали для $\text{C}_{90}\text{H}_{96}\text{N}_{20}\text{O}_{11}$, *масса/заряд* 1633,74, результат составил 817,5 ($m/2$)⁺.

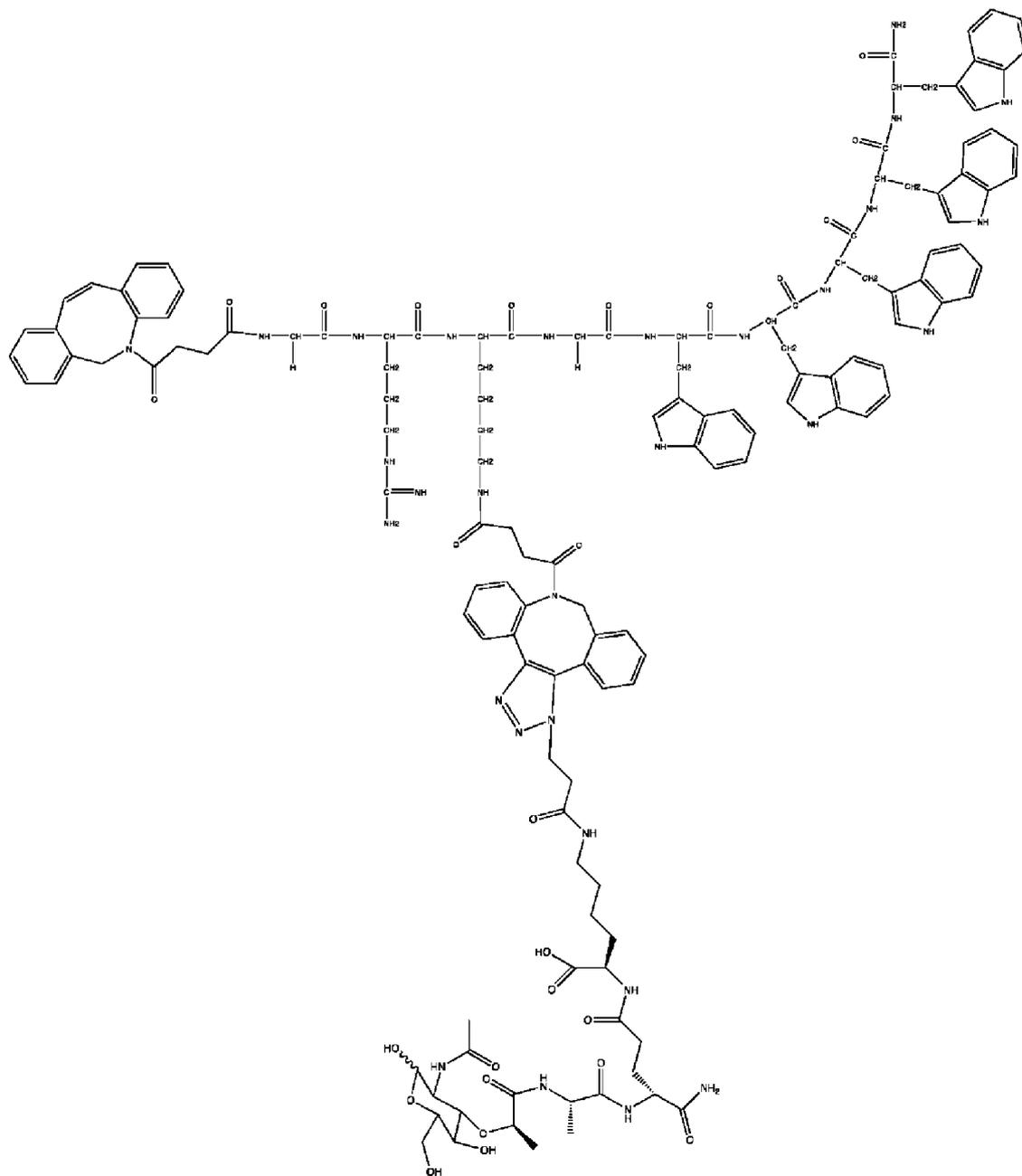
[00494] **Соединение 34**



[00495] **Соединение 34**, именуемое как Мурамил Азид, который представляет собой агонист NOD 2, синтезировали с применением Мурамил три-лизина (M-TriLys, Инвиводжен) и сульфо NHS Азидопропионовой кислоты в качестве исходных материалов. 5 мг мурамилтрилизина (0,008 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл сухого DMSO с TEA (0,02 ммоль, 2,5 экв.), и добавляли 2,2 мг сульфо NHS Азидопропионовой кислоты (0,008 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часа. Реакционную смесь гасили амино-2-пропанолом (0,008 ммоль, 1 экв.), и промежуточное соединение применяли немедленно для реакции.

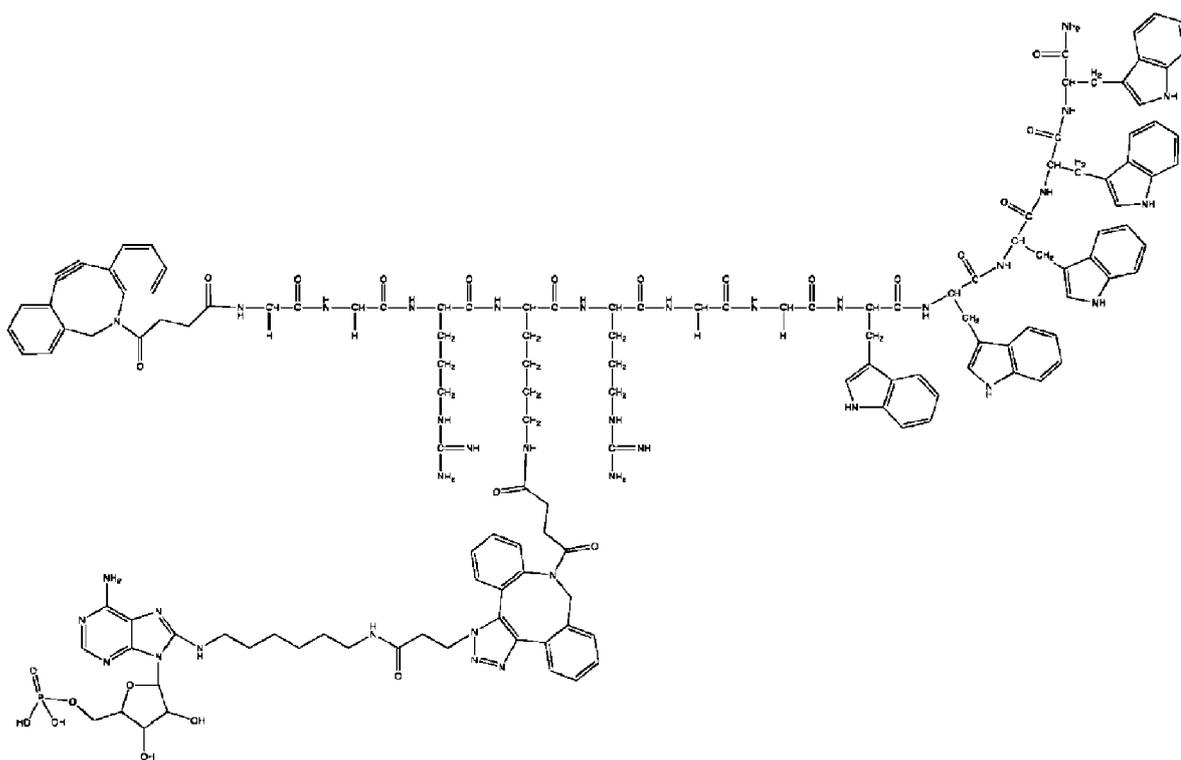
[00496] **Соединение 35**

] **Compound 35**



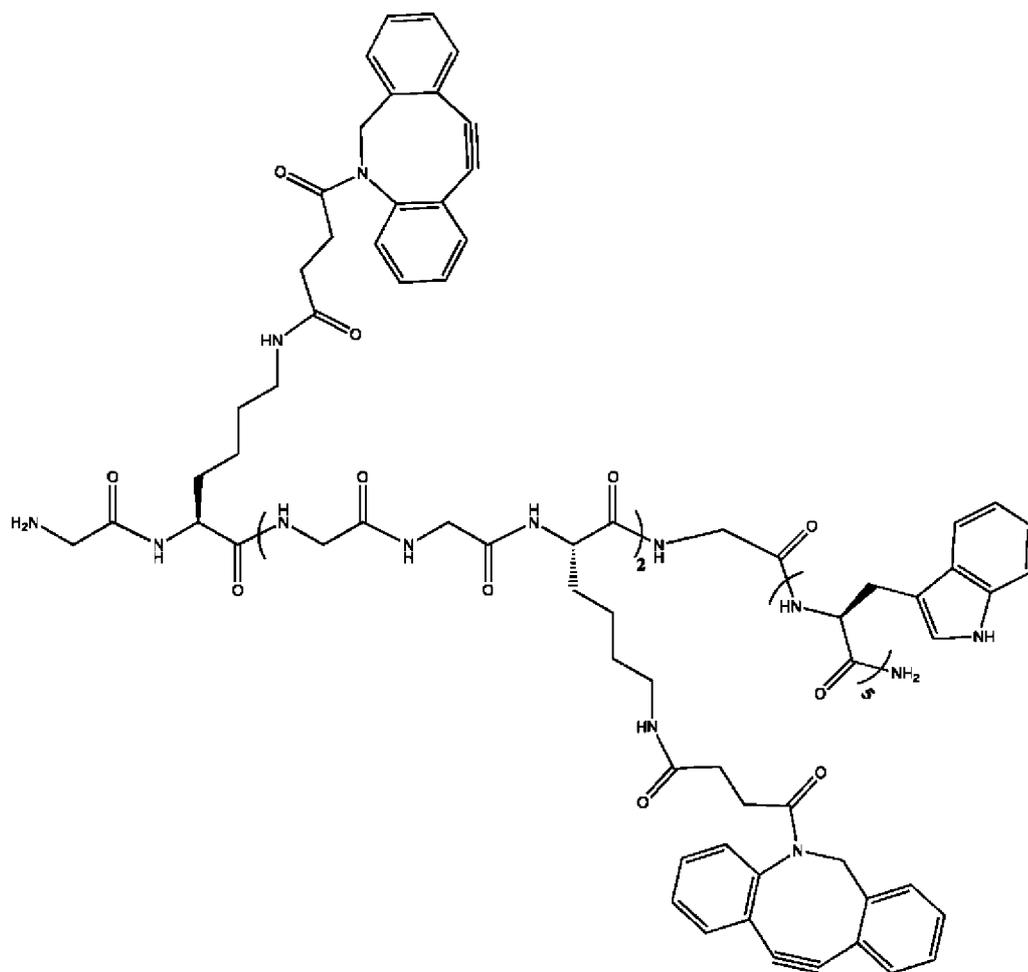
[00497] **Соединение 35**, именуемое как DBCO-GRK(Мурамил)GW₅, Мурамил-W₅ или DBCO(Мурамил)W₅, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 30**, за исключением того факта, что **Соединения 33** и **34** применялись в качестве исходного материала. **Соединение 35** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 35-65% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 4.6 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали. MS (ESI) рассчитывали для C₁₃₇H₁₅₈N₃₀O₂₆, *масса/заряд* 2639,2, результат составил 1319,5 (m/2)⁺.

[00498] **Соединение 36**



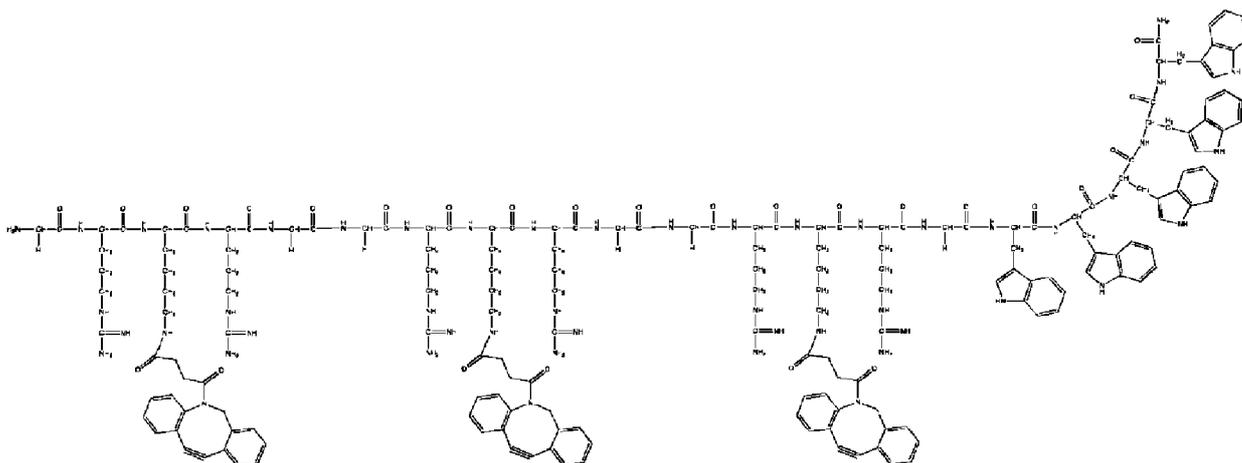
[00501] **Соединение 37**, именуемое как DBCO-GGRK(AMP)RGW₅ или DBCO(AMP)W₅, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 30**, за исключением того факта, что **Соединение 36** и аденозинмонофосфат 8-(6-Аминогексил)аминоаденозин 5' монофосфат (Сигма-Олдрич), замещенный азидопропионовой кислотой, применяли в качестве исходных материалов. **Соединение 37** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-60% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Продукт элюировали в течение 5.2 минут, и полученные фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением спектроскопически чистого белого твердого вещества. MS (ESI) рассчитывали для C₁₃₈H₁₅₈N₃₇O₂₄P, масса/заряд 2748,2, результат составил 917,5 (m/3)⁺.

[00502] **Соединение 38**



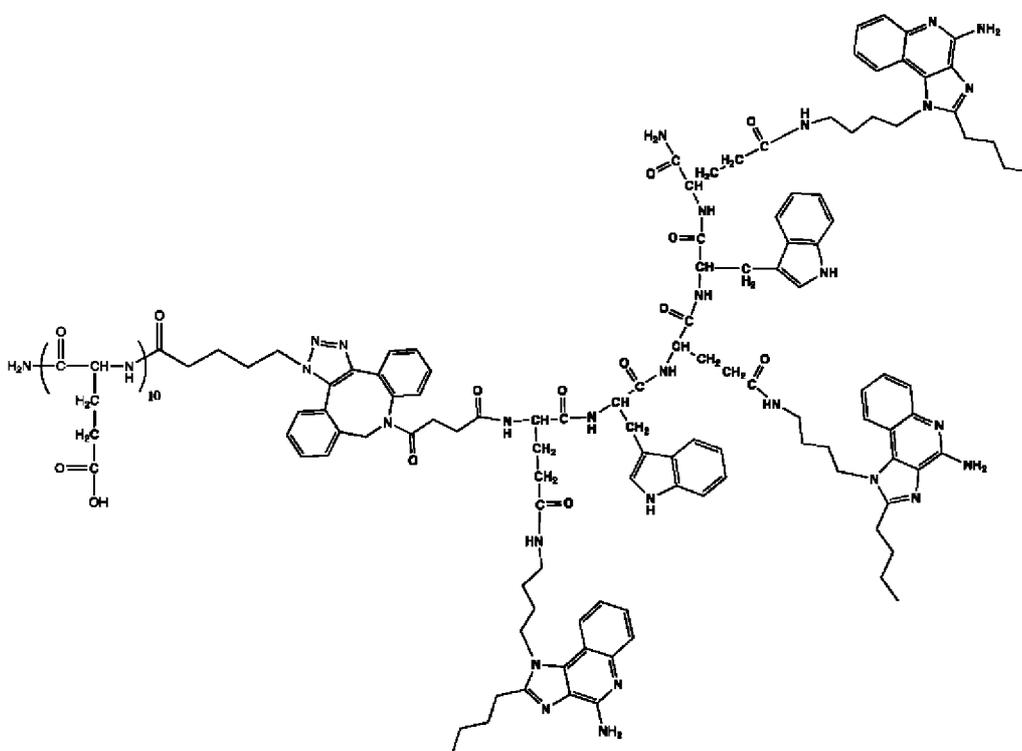
[00505] **Соединение 39**, именуемое как $\text{NH}_2\text{-GK(DBCO)[GGK(DBCO)]}_2\text{GW}_5$, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 28**, за исключением того факта, что Fmoc-GK(GGK)₂GW₅-NH₂ применяли в качестве исходного материала, и применяли три дополнительных эквивалента TEA и DBCO-NHS. **Соединение 39** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 45-85% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением титульного соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для C₁₄₂H₁₄₆N₂₆O₂₀, *масса/заряд* 2535,12, результат составил 1269 (m/2)⁺.

[00506] **Соединение 40**



[00507] **Соединение 40**, именуемое как $\text{NH}_2\text{-[GRK(DBCO)RG]}_3\text{-W}_5$, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 39**, за исключением того факта, что $\text{NH}_2\text{-[GRK(DBCO)RG]}_3\text{-W}_5$ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 40** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 35-65% ацетонитрил/ H_2O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением спектроскопически чистого ($> 95\%$ AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для $\text{C}_{178}\text{H}_{218}\text{N}_{50}\text{O}_{26}$, *масса/заряд* 3471,31, результат составил 695,6 ($m/5$)⁺.

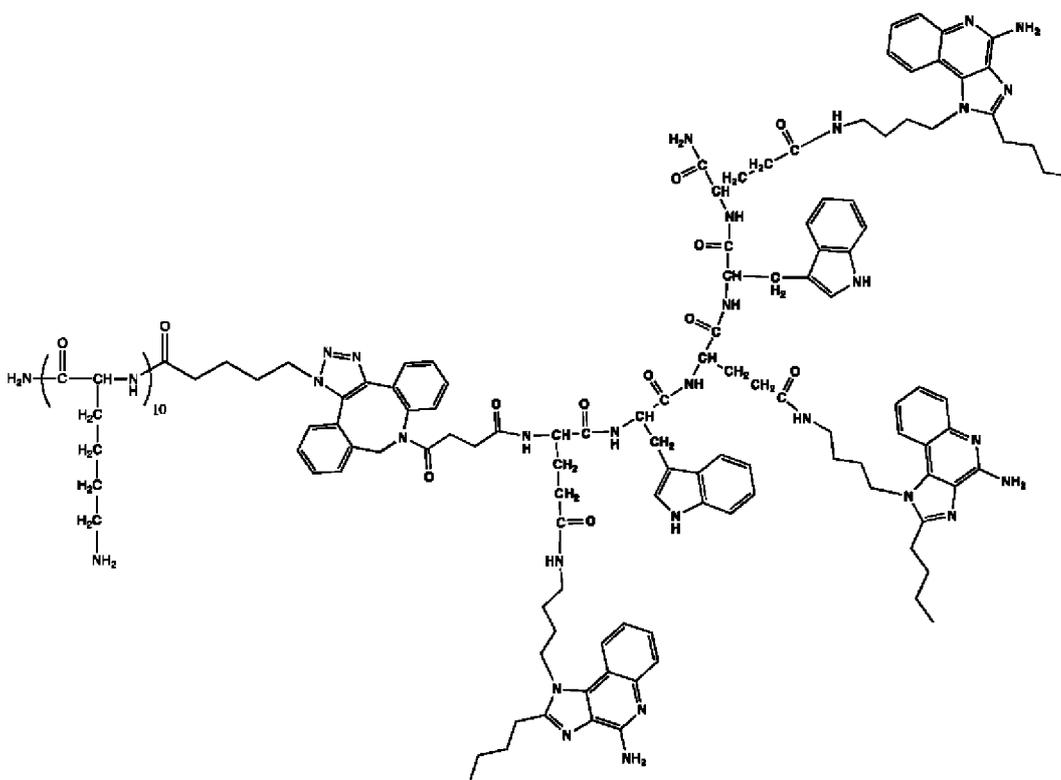
[00508] **Соединение 41**



[00509] **Соединение 41**, именуемое как $\text{E}_{10}\text{-2B}_3\text{W}_2$, синтезировали с применением Азидо-(Glu)₁₀-NH₂ и **Соединения 6** в качестве исходных материалов. 5 мг Азидо-(Glu)₁₀-

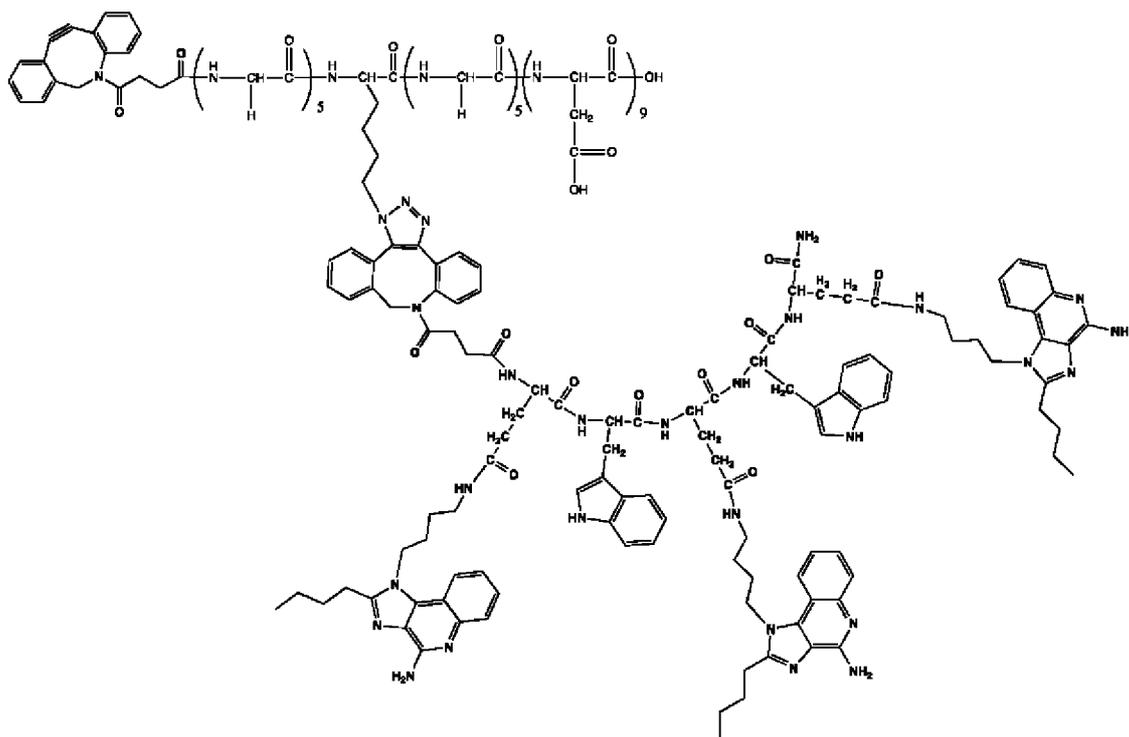
NH₂ (0,0035 ммоль, 1 экв.) растворяли в сухом DMSO и добавляли 6,77 мг **Соединения 6** (0,0035 ммоль, 1 экв.) в качестве 40 мг/мл раствора в сухом DMSO. Реакционную смесь встряхивали в течение ночи при комнатной температуре. **Соединение 41** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 25-45% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 11,8 мг спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка с количественным выходом. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3377,31, результат составил 1127 (M/3)⁺.

[00510] **Соединение 42**



[00511] **Соединение 42**, именуемое как K₁₀-2B₃W₂, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 41**, за исключением того факта, что Азидо-(Lys)₁₀-NH₂ применяли в качестве исходных материалов. **Соединение 42** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 20-40% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка с количественным выходом. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3367,58, результат составил 482 (M/7)⁺.

[00512] **Соединение 43**



[00513] **Соединение 43**, именуемое как DBCO-G₅-2B₃W₂-G₅-D₉ или DBCO-2B₃W₂(D)₉, синтезировали с применением NH₂-(Gly)₅-Lys(N₃)-(Gly)₅-(Asp)₉-NH₂, **Соединение 6** и DBCO-NHS в качестве исходных материалов. 5 мг NH₂-(Gly)₅-Lys(N₃)-(Gly)₅-(Asp)₉-NH₂ (0,0028 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,1 мл сухого DMSO и добавляли 6,56 мг **Соединения 6** (0,0034 ммоль, 1,2 экв.). Реакционную смесь встряхивали в течение ночи при комнатной температуре. Добавляли 3,55 мг DBCO-NHS (0,0084 ммоль, 3 экв.), после чего добавляли TEA (0,0028 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре. **Соединение 43** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-40% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30x100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 3,8 мг (выход 33,7%) титального соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для массы/заряда 4008,31, результат составил 1003,3 (m/4)⁺.

[00514] **Соединение 44**, именуемое как DBCO-G₅-2B₃W₂-G₅-D₈ или DBCO-2B₃W₂(D)₈, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 43**, за исключением того факта, что NH₂-(Gly)₅-Lys(N₃)-(Gly)₅-(Asp)₈-NH₂ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 44** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 30-40% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение

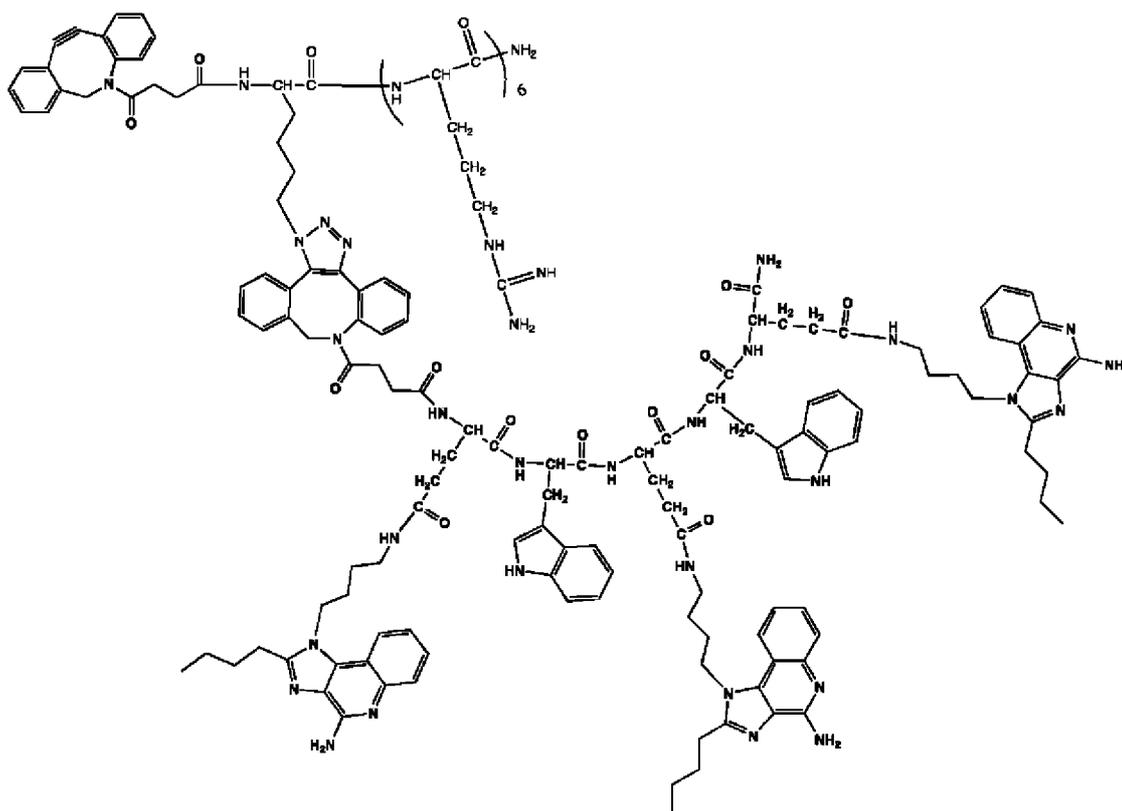
12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30x100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением титульного соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3894,52, результат составил 974,6 (m/4)⁺.

[00515] **Соединение 45**, именуемое как DBCO-G₅-2B₃W₂-G₅-D₇ или DBCO-2B₃W₂(D)₇, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 43**, за исключением того факта, что NH₂-(Gly)₅-Lys(N₃)-(Gly)₅-(Asp)₇-NH₂ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 45** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 29-39% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением титульного соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3779,43, результат составил 945,8 (m/4)⁺.

[00516] **Соединение 46**, именуемое как DBCO-G₅-2B₃W₂-G₅-D₆ или DBCO-2B₃W₂(D)₆, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 43**, за исключением того факта, что NH₂-(Gly)₅-Lys(N₃)-(Gly)₅-(Asp)₆-NH₂ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 46** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 29-39% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением титульного соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3664,35, результат составил 917,1 (m/4)⁺.

[00517] **Соединение 47**, именуемое как DBCO-G₅-2B₃W₂-G₅-D₅ или DBCO-2B₃W₂(D)₅, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 43**, за исключением того факта, что NH₂-(Gly)₅-Lys(N₃)-(Gly)₅-(Asp)₅-NH₂ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 47** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 29-41% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30x100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением титульного соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3549,26, результат составил 1184,1 (m/3)⁺.

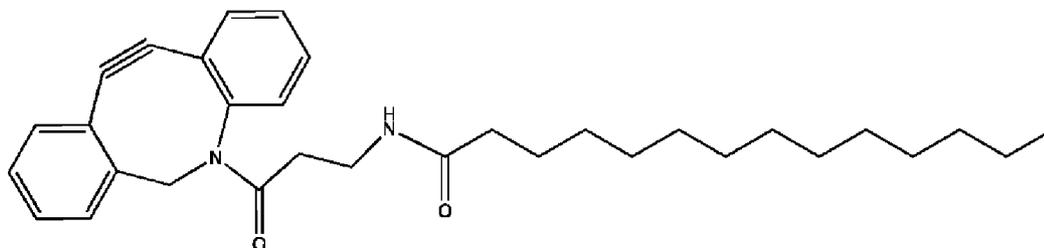
[00518] **Соединение 48**



[00519]

[00520] **Соединение 48**, именуемое как DBCO-2B₃W₂-R₆ или DBCO-2B₃W₂(R)₆, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 43**, за исключением того факта, что NH₂-Lys(N₃)-(Arg)₆-NH₂ применяли в качестве исходного материала. **Соединение 48** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 26-36% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 17,8 мг (выход 51,8%) титульного соединения в качестве спектроскопически чистого (> 95% AUC при 254 нм) белого порошка. MS (ESI) рассчитывали для *массы/заряда* 3338,19, результат составил 478,1 (m/7)⁺.

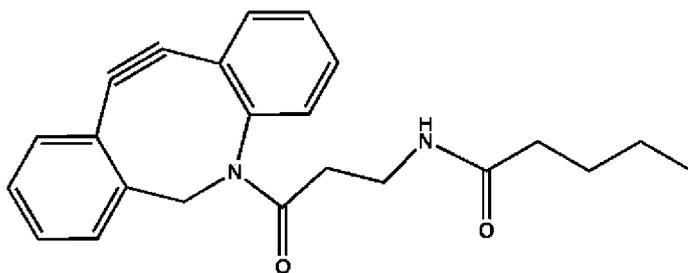
[00521] **Соединение 49**



[00522] **Соединение 49**, именуемое как Mуг-DBCO или C14-DBCO, получали из Миристоилхлорида и DBCO-Амина. 50 мг DBCO-Амина (0,18 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл DCM. Добавляли TEA (0,22 ммоль, 1,2 экв.), и раствор встряхивали в течение 5

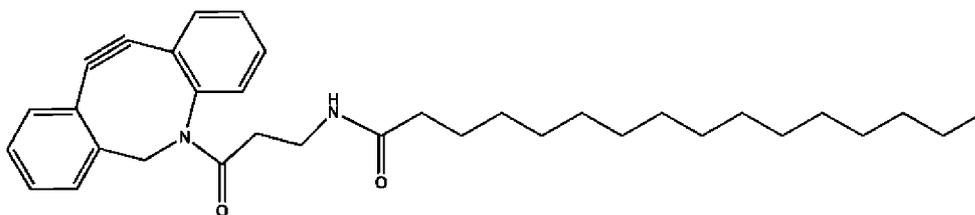
минут при комнатной температуре. Добавляли Миристоилхлорид (0,16 ммоль, 0,9 экв.), и реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре. TLC (2,5% метанол в DCM) показала новое пятно с коэффициентом удерживания (rf) 0,5 для Муг-DBCO. Реакционную смесь впрыскивали в колонку флэш-хроматографии и очищали с применением градиента 0-3% метанола в DCM в 12 CV. Фракции собирали и высушивали с получением 86 мг Муг-DBCO с количественным выходом. MS (ESI) рассчитывали для $C_{32}H_{42}N_2O_2$, *масса/заряд* 486,32, результат составил 487,3 (m+H)⁺.

[00523] **Соединение 50**



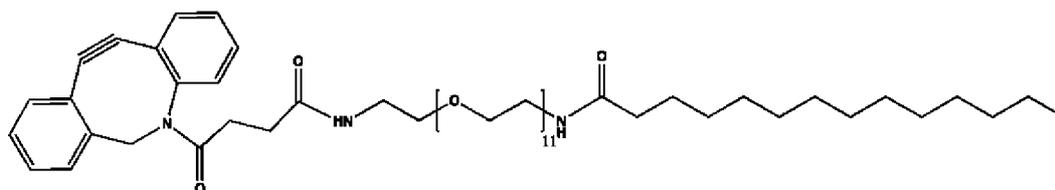
[00524] **Соединение 50**, именуемое как Val-DBCO или C5-DBCO, получали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 49**, за исключением того факта, что Валероилхлорид применяли в качестве исходного материала. Val-DBCO очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 40-60% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. Полученные фракции собирали, замораживали и затем лиофилизировали с получением 80 мг Val-DBCO с количественным выходом. MS (ESI) рассчитывали для $C_{23}H_{24}N_2O_2$, *масса/заряд* 360,18, результат составил 361,2 (m+H)⁺.

[00525] **Соединение 51**



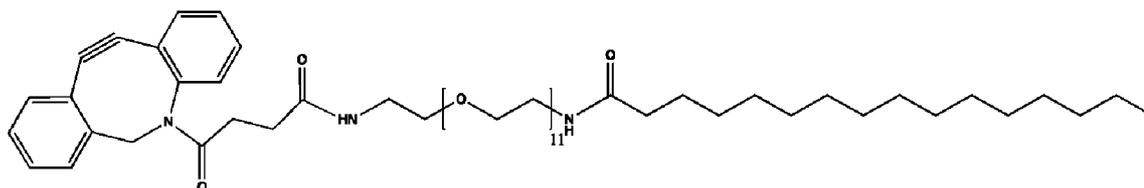
[00526] **Соединение 51**, именуемое как Plm-DBCO или C16-DBCO, получали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 49**, за исключением того факта, что Пальмитоилхлорид применяли в качестве исходного материала. **Соединение 51** очищали флэш-хроматографией с применением градиента 0-3% метанола в DCM в 12 CV. Фракции собирали и высушивали с получением 80 мг Plm-DBCO с количественным выходом. MS (ESI) рассчитывали для $C_{34}H_{46}N_2O_2$, *масса/заряд* 514,36, результат составил 515,3 (m+H)⁺.

[00527] **Соединение 52**



[00528] **Соединение 52**, именуемое как Mуг-Peg₁₁-DBCO или C14-PEG11-DBCO, синтезировали с применением Миристоилхлорида, Вос-Peg₁₁-Амина и DBCO-NHS в качестве исходных материалов. 116,06 мг Вос-Peg₁₁-Амина (0,18 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл DCM. Добавляли TEA (0,22 ммоль, 1,2 экв.), и реакцию смесь встряхивали в течение 5 минут при комнатной температуре. Добавляли Миристоилхлорид, и реакцию смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляли DCM и дважды промывали 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и упаривали. Промежуточное соединение растворяли в 0,35 мл DCM и добавляли 0,15 мл TFA. Реакционную смесь встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем высушивали продувкой воздухом и дополнительно высушивали в высоком вакууме. 122,5 мг масла (0,162 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл DCM. Добавляли TEA (0,49 ммоль, 3 экв.), и раствор встряхивали в течение 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 65,19 мг DBCO-NHS (0,162 ммоль, 1 экв.), и реакцию смесь встряхивали течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь впрыскивали в колонку флэш-хроматографии и очищали с применением градиента 0-15% метанола в DCM в 15 CV. Фракции собирали и высушивали с получением Mуг-Peg₁₁-DBCO. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов **Соединения 52**.

[00529] **Соединение 53**

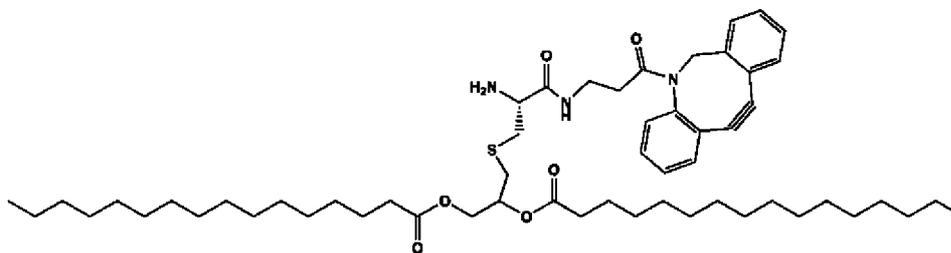


[00530] **Соединение 53**, именуемое как Plm-Peg₁₁-DBCO или C16-PEG11-DBCO, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 52**, за исключением того факта, что Пальмитоилхлорид применяли в качестве исходного материала.

[00531] Plm-Peg₁₁-DBCO очищали флэш-хроматографией с применением градиента 0-15% метанола в DCM в 15 CV. Фракции собирали и высушивали с получением Plm-

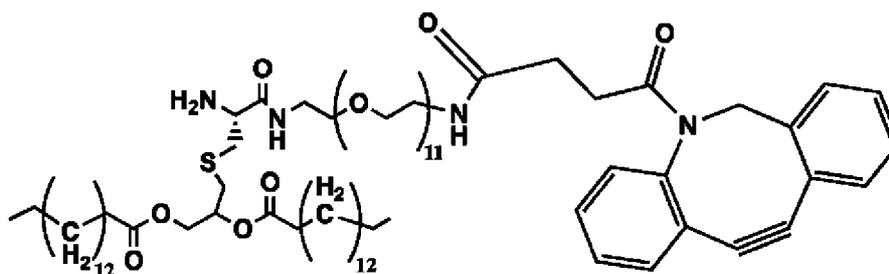
Peg₁₁-DBCO. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов **Соединения 53**.

[00532] **Соединение 54**



[00533] **Соединение 54**, именуемое как NH₂-Pam2Cys-DBCO, синтезировали с применением **Соединения 26** и DBCO-Амина в качестве исходных материалов. 30 мг **Соединения 26** (0,03 ммоль, 1 экв.) готовили в виде базового раствора в концентрации 100 мг/мл в DCM. К этому исходному раствору добавляли 8,34 мг DBCO-Амина (0,03 ммоль, 1 экв.) также в виде базового раствора в концентрации 100 мг/мл в DCM. Реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем впрыскивали в колонку флэш-хроматографии и очищали. Применяемый градиент представлял собой ступенчатый градиент от 0-5% метанола в DCM (удерживание 5CV, 1CV для увеличения концентрации метанола на 1%). Фракции собирали и высушивали с получением промежуточного соединения DBCO. 26 мг Fmoc-Pam2Cys-DBCO (0,023 ммоль, 1 экв.) растворяли в 1 мл 20% Пиперидина в растворе DMF и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли DCM и трижды промывали DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и упаривали. Твердое вещество помещали в 0,5 мл DCM и впрыскивали в колонку флэш-хроматографии, и очищали. Применяемый градиент представлял собой ступенчатый градиент от 0-5% метанола в DCM. Фракции собирали и высушивали с получением NH₂-Pam2Cys-DBCO. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов **Соединения 54**.

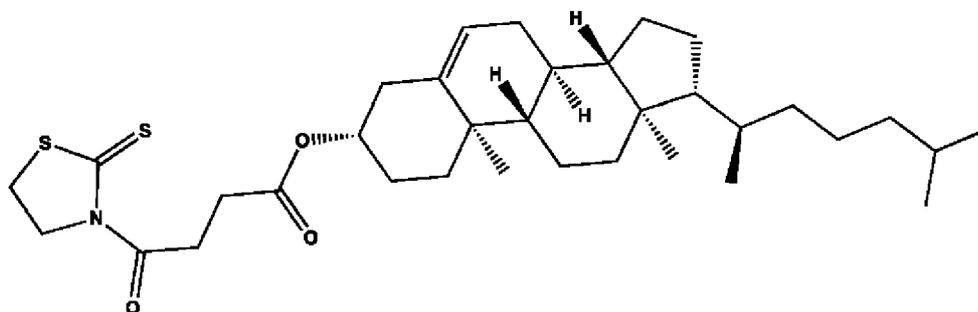
[00534] **Соединение 55**



[00535] **Соединение 55**, именуемое как $\text{NH}_2\text{-Pam2Cys-Peg}_{11}\text{-DBCO}$, синтезировали с применением **Соединения 26**, $\text{Woc-Peg}_{11}\text{-Амина}$ и DBCO NHS в качестве исходных материалов. 60 мг **Соединения 26** (0,06 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,6 мл DCM. Добавляли 38,9 мг $\text{Woc-Peg}_{11}\text{-Амина}$ (0,06 ммоль, 1 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 30 минут. DCM удаляли в вакууме, и масло помещали в DMSO и добавляли к DI воде. Воду центрифугировали при ускорении 3000 g в течение 5 минут, а пеллет собирали и высушивали в вакууме. Пегилированное промежуточное соединение растворяли в 0,35 мл DCM и добавляли 0,15 мл TFA. Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем высушивали продувкой воздухом и дополнительно высушивали в высоком вакууме. 71,76 мг масла с удаленной защитой Woc (0,05 ммоль, 1 экв.) растворяли в 1 мл DMSO и добавляли TEA (0,1 ммоль, 2 экв.), после чего добавляли 20,3 мг DBCO-NHS (0,05 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляли 0,5 мл 20% пиперидина в DMF, и реакционную смесь встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли DCM и трижды промывали бикарбонатом натрия с pH 9,5. Органический слой высушивали сульфатом натрия и упаривали. Твердое вещество помещали в 0,5 мл DCM и впрыскивали в колонку флэш-хроматографии, и очищали. Применяемый градиент составлял 0-10% метанола в DCM в 30 CV. В результате получили продукт с общим выходом 6,7%. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов

Соединения 55.

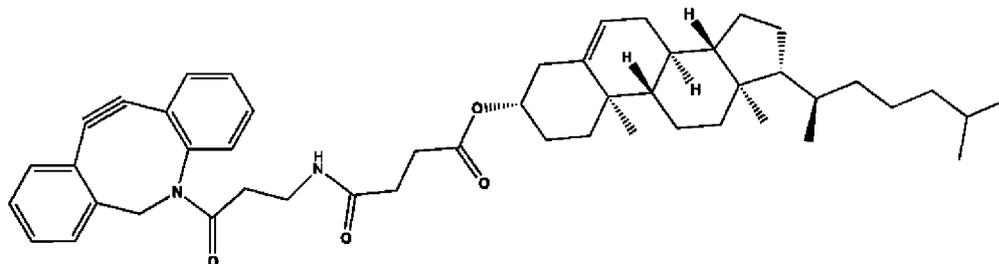
[00536] **Соединение 56**



[00537] **Соединение 56**, именуемое Chol-TT, получали с применением Холестерилгемисукцината и TT в качестве исходных материалов. 100 мг Холестерилгемисукцината (0,21 ммоль, 1 экв.), 26,94 мг TT (0,23 ммоль, 1,1 экв.) и 51,20 г EDC (0,27 ммоль, 1,3 экв.) растворяли в 1 мл DCM. Добавляли 2,51 мг DMAP (0,02 ммоль, 0.1 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре. Через 1 час,

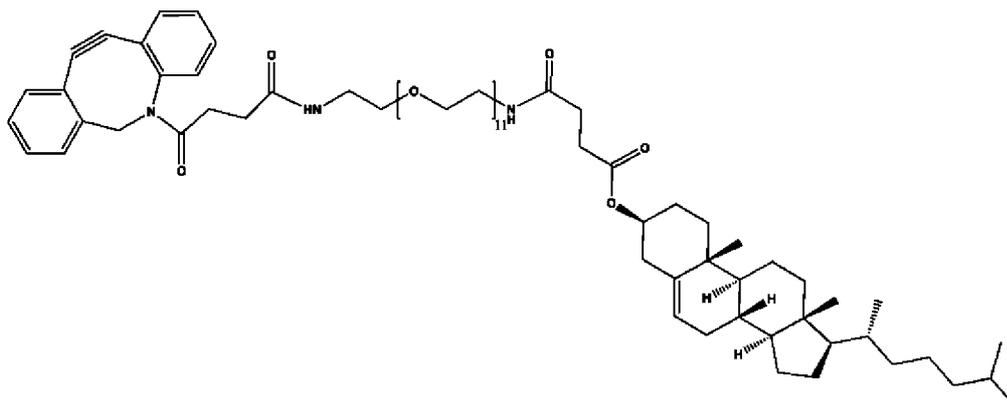
ярко-желтую реакционную смесь разбавляли DCM и дважды промывали 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и упаривали с получением 120 мг желтого твердого вещества с количественным выходом. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов **Соединения 56**.

[00538] **Соединение 57**



[00539] **Соединение 57**, именуемое Chol-DBCO, получали из **Соединения 56** и DBCO-Амина. 106,28 мг **Соединения 56** (0,18 ммоль, 1 экв.) и 50 мг DBCO-Амина (0,18 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл DCM, и встряхивали при комнатной температуре. В течение часа, ярко-желтый цвет раствора исчезал, и TLC в DCM свидетельствовала о полном отсутствии **Соединения 56**. Реакционную смесь впрыскивали в колонку флэш-хроматографии и очищали с применением градиента 0-3% метанола в DCM в 12 CV. Фракции собирали и высушивали с получением 139 мг Chol-DBCO с количественным выходом. Молекулярную массу продукта подтверждали на основе MS (ESI+) для пептидных антигенных конъюгатов **Соединения 57**.

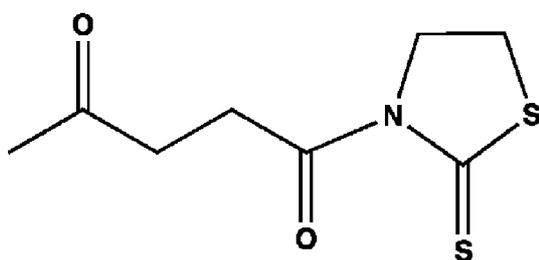
[00540] **Соединение 58**



[00541] **Соединение 58**, именуемое Chol-Peg₁₁-DBCO, получали из **Соединения 56**, Вос-Peg₁₁-амина и DBCO-NHS. 50 мг **Соединения 56** (0,085 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл DCM. Добавляли 60,38 мг Вос-Peg₁₁-амина (0,09 ммоль, 1.1 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре. В течение часа, ярко-желтый цвет раствора исчезал, и TLC в DCM свидетельствовала о полном отсутствии **Соединения 56**.

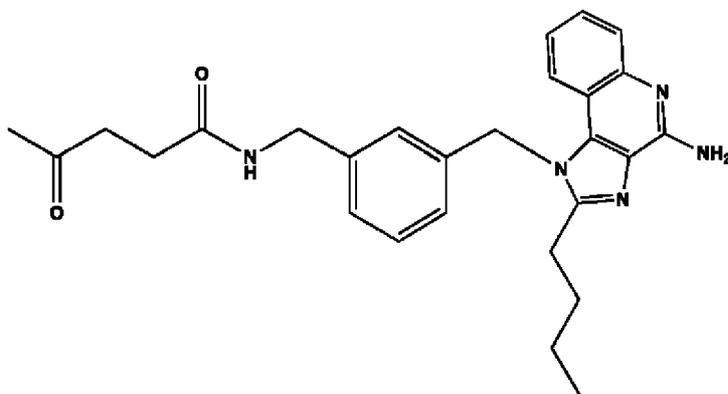
В реакционную смесь добавляли 150 мкл TFA, чтобы получить 30% раствор в DCM. Реакционную смесь встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем высушивали продувкой воздухом и дополнительно высушивали в высоком вакууме. 86,25 мг масла (0,085 ммоль, 1 экв.) растворяли в 0,5 мл DCM. Добавляли TEA (0,26 ммоль, 3 экв.), и раствор встряхивали в течение 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 34,26 мг DBCO-NHS (0,085 ммоль, 1 экв.), и реакционную смесь встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь впрыскивали в колонку флэш-хроматографии и очищали с применением градиента 0-15% метанола в DCM в 15 CV. Фракции собирали и высушивали с получением Chol-Peg₁₁-DBCO.

[00542] **Соединение 59**



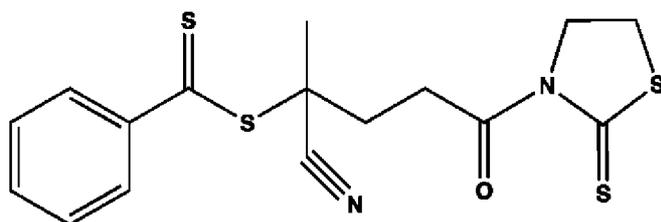
[00543] **Соединение 59**, именуемое как LA-ТТ, синтезировали с применением Левулиновой кислоты и ТТ в качестве исходных материалов. 500 мг Левулиновой кислоты (4,3 ммоль, 1 экв.), 564,7 мг ТТ (4,7 ммоль, 1,1 экв.) и 1,032 г EDC (5,4 ммоль, 1,3 экв.) растворяли в 10 мл сухого DMSO. Добавляли 52,6 мг DMAP (0,4 ммоль, 0,1 экв.), и реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часа. **Соединение 59** обрабатывали путем разбавления в Этилацетате и промывали дважды 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и удаляли в вакууме. Твердое вещество перекристаллизовывали из Этилацетата. MS (ESI) рассчитывали для C₈H₁₁NO₂S₂, *масса/заряд* 217,02, результат составил 218 (M+H)⁺.

[00544] **Соединение 60**



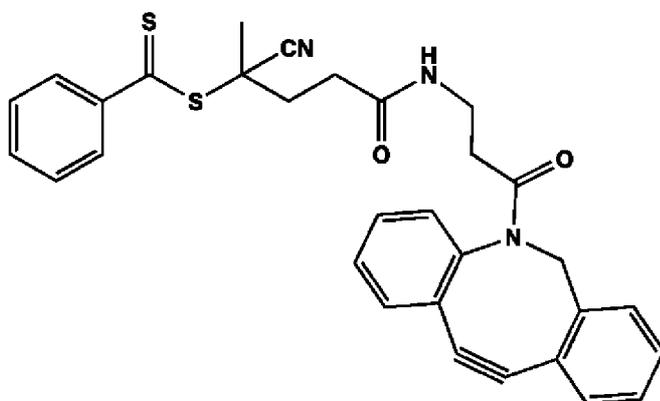
[00545] **Соединение 60**, именуемое как LA-2ВХу, синтезировали с применением **Соединения 59** и **Соединения 2** в качестве исходных материалов. 50 мг **Соединения 59** (0,23 ммоль, 1 экв.) и 82,62 мг **Соединения 2** (0,23 ммоль, 1 экв.) растворяли в 1 мл DMSO. Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 1 часа. TLC (35% этилацетат в гексане) показала исчезновение обоих исходных материалов. **Соединение 60** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 15-30% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. MS (ESI) рассчитывали для C₂₇H₃₁N₅O₂, *масса/заряд* 457,25, результат составил 458,3 (M+H)⁺.

[00546] **Соединение 61**



[00547] **Соединение 61**, именуемое как СТА-ТТ, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 59**, за исключением того факта, что 4-Циано-4-(тиобензоилтио)пентановая кислота (СТА) применялась в качестве исходного материала, а DCM применялся в качестве растворителя. **Соединение 61** обрабатывали путем разбавления в DCM и промывали дважды 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и удаляли в вакууме. Твердое вещество перекристаллизовывали из Этилацетата. MS (ESI) рассчитывали для C₁₆H₁₆N₂OS₄, *масса/заряд* 380,01, результат составил 381,1 (M+H)⁺.

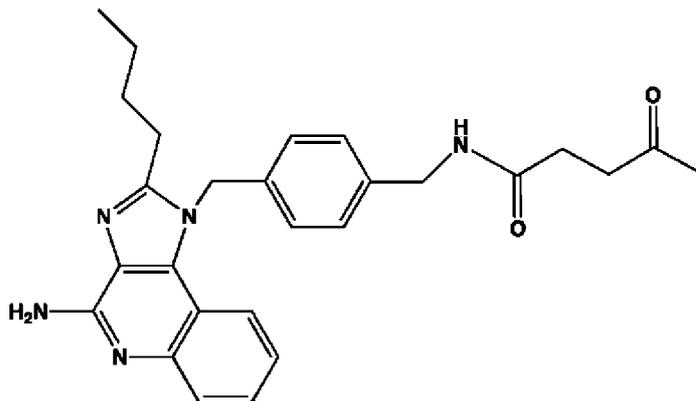
[00548] **Соединение 62**



[00549] **Соединение 62**, именуемое как СТА-DBCO, синтезировали из «СТА-NHS» (N-сукцинимидиловый эфир 4-Циано-4-(фенилкарбонотиоилтио)пентановой кислоты, (Сигма-Олдрич) и DBCO-Амина (инструменты клик-химии). 210 мг СТА-NHS (0,56

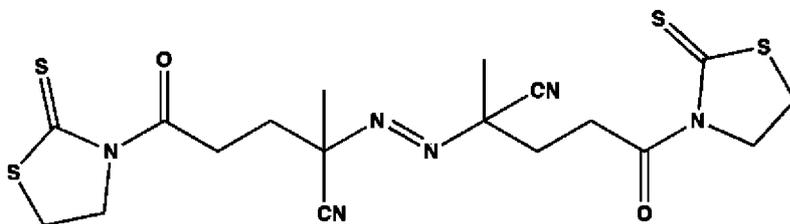
ммоль, 1 экв.) и 167,8 мг DBCO-Амина (0,61 ммоль, 1,1 экв.) растворяли в 2 мл сухого DMSO и встряхивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли DCM и дважды промывали 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и упаривали. **Соединение 62** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 50-70% ацетонитрил/H₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30x100 мм, 5 мкм. MS (ESI) рассчитывали для C₃₁H₂₇N₃O₂S₂, *масса/заряд* 537,7, результат составил 538,2 (M+H)⁺.

[00550] **Соединение 63**



[00551] **Соединение 63**, именуемое как СТА-2ВХУ, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 60**, за исключением того факта, что **Соединение 61** и **Соединение 2** применяли в качестве исходных материалов. **Соединение 63** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 40-50% ацетонитрил/H₂O (0,05% TFA) в течение 12 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50x100 мм, 5 мкм. MS (ESI) рассчитывали для C₃₅H₃₆N₆OS₂, *масса/заряд* 620,83, результат составил 621,2 (M+H)⁺.

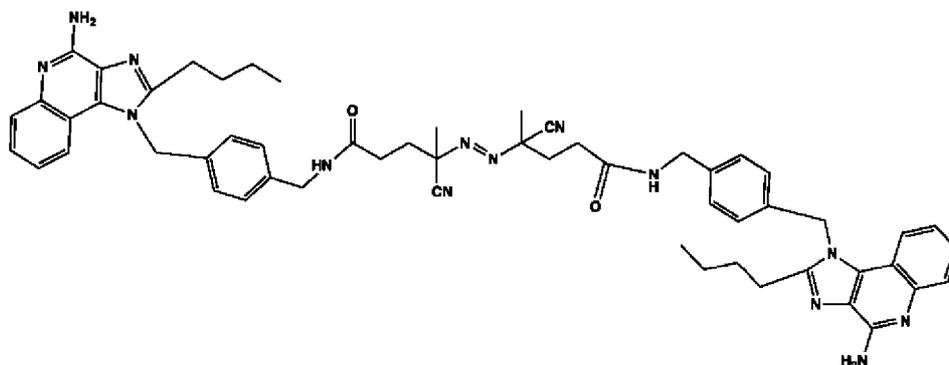
[00552] **Соединение 64**



[00553] **Соединение 66**, именуемое как ACVA-ТТ, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 59**, за исключением того факта, что 4,4'-Азобис(4-циановалериановая кислота) применялся в качестве исходного материала, а эквиваленты ТТ, EDC и DMAP были удвоены, чтобы отразить удвоение активных сайтов. **Соединение 66** обрабатывали путем разбавления в Этилацетате и

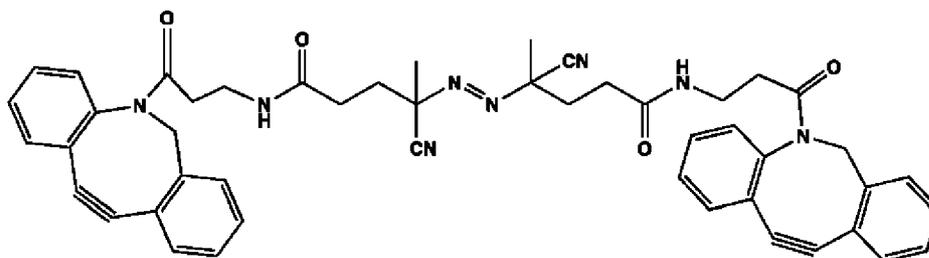
промывали дважды 1 молярным раствором HCl и один раз DI водой. Органический слой высушивали сульфатом натрия и удаляли в вакууме. Твердое вещество перекристаллизовывали из DCM:Эфир. MS (ESI) рассчитывали для C₁₈H₂₂N₆O₂S₄, *масса/заряд* 482,65, результат составил 483,1 (M+H)⁺.

[00554] **Соединение 65**



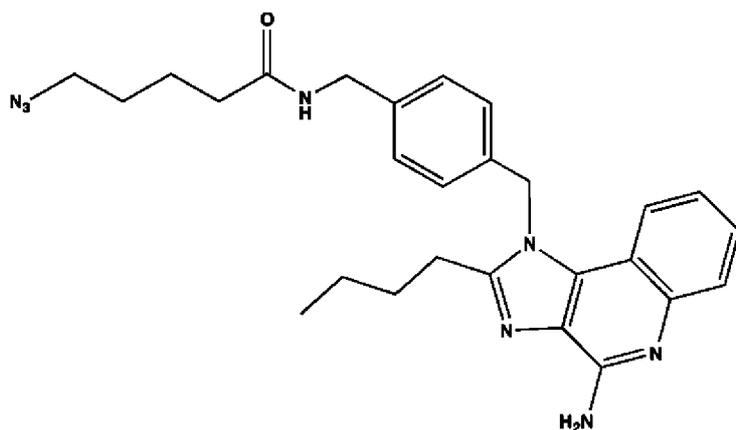
[00555] **Соединение 65**, именуемое как ACVA-2ВХу, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 60**, за исключением того факта, что **Соединение 64** применяли в качестве исходного материала, а эквиваленты **Соединения 2** удваивали, чтобы отразить удвоение активных сайтов. **Соединение 65** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 28-48% ацетонитрил/Н₂О (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 50×100 мм, 5 мкм. MS (ESI) рассчитывали для C₅₆H₆₂N₁₄O₂, *масса/заряд* 963,21, результат составил 482,4 (M/2)⁺.

[00556] **Соединение 66**



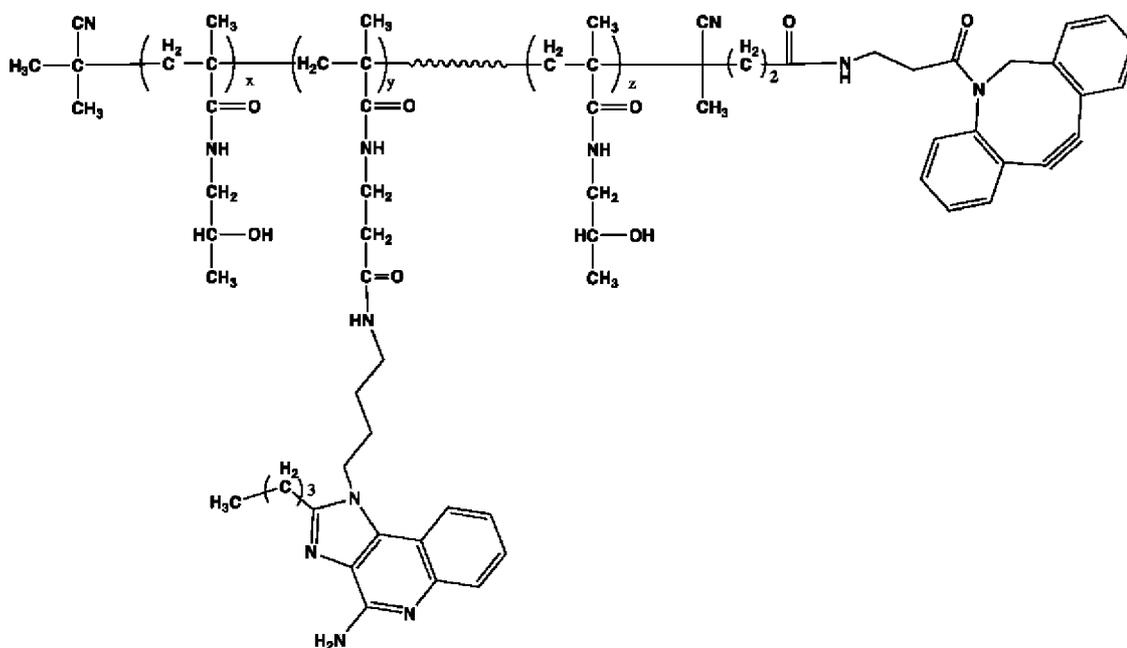
[00557] **Соединение 66**, именуемое как ACVA-DBCО, синтезировали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 60**, за исключением того факта, что **Соединение 64** и DBCO-Амин (инструменты клик-химии) применяли в качестве исходных материалов. **Соединение 66** очищали флэш-хроматографией с применением градиента 0-3% метанола в DCM в 15 CV. MS (ESI) рассчитывали для C₄₈H₄₄N₈O₄, *масса/заряд* 796,93, результат составил 797,3 (M+H)⁺.

[00558] **Соединение 67**



[00559] **Соединение 67**, именуемое как Azp-2ВХУ, синтезировали из 5-Азидопентановой кислоты (Azp) и **Соединения 2**. 16,2 мг Azp (0,114 ммоль, 1,1 экв.), 12,3 мг ТТ (0,103 ммоль, 1 экв.) и 27,2 мг EDC (0,142 ммоль, 1,3 экв.) растворяли в 0,5 мл сухого DMSO. Добавляли 1,4 DMAP, и реакционную смесь встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Добавляли 37,09 **Соединения 2** (0,103 ммоль, 1 экв.), и реакционную смесь встряхивали в течение 1 часов при комнатной температуре. **Соединение 67** очищали в препаративной системе ВЭЖХ с применением градиента 22-42% ацетонитрил/Н₂O (0,05% TFA) в течение 10 минут на колонке Agilent Prep-C18, 30×100 мм, 5 мкм. MS (ESI) рассчитывали для C₂₇H₃₂N₈O, *масса/заряд* 484,27, результат составил 485,3 (M+H)⁺.

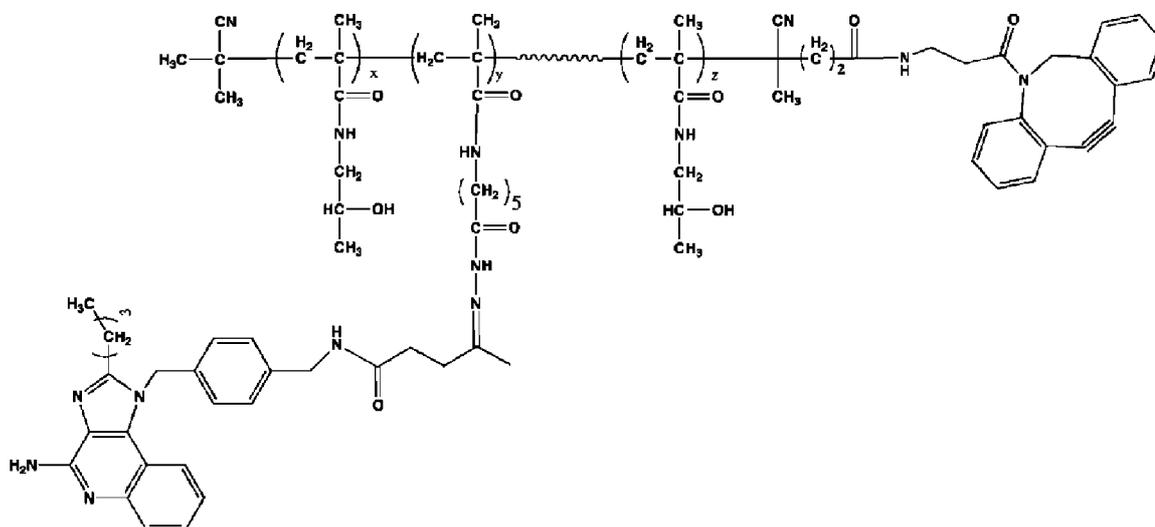
[00560] **Соединение 68**



[00561] **Соединение 68**, также именуемое как (HPMA-2В)-b-(HPMA)-DВСО или p{[(HPMA)-co-(MA-b-Ala-2В)]-b-p(HPMA)}-DВСО. Мицеллообразующий диблок-сополимер (тип А-В) продуцировали полимеризацией RAFT в две стадии синтеза с

применением предшественников HPMA и MA-b-Ala-TT, полученных, как описано ранее (см. Линн Г.М., и др. *Nat Biotechnol* 33(11): 1201-1210, 2015), а также 2-Циано-2-пропилбензодитиоата («СТА-АВІН», Сигма-Олдрич), Азобисизобутиронитрила («АІВН, Сигма-Олдрич»), **Соединения 1** и **Соединения 66**. Гидрофобный блок А получали сополимеризацией HPMA с MA-b-Ala-TT с применением СТА-АІВН в качестве агента передачи цепи и АІВН в качестве инициатора при температуре 70° С в течение 16 часов в смеси трет-бутиловый спирт/DMSO. Гидрофобный блок В впоследствии подвергали полимеризации с удлинением цепи посредством механизма RAFT путем добавления HPMA в присутствии АІВН при температуре 70° С в течение дополнительных 16 часов. Диблок-сополимер А-В, $p\{[(HPMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}TT)]\text{-}b\text{-}p(HPMA)\}\text{-}DTB$, выделяли осаждением с выходом зеленого твердого вещества. Группу DTB на одном конце сополимера заменяли посредством проведения реакции с **Соединением 66** при температуре 80° С в течение 2 часов в DMSO, после чего добавляли **Соединение 1**. Продукт осаждали и затем очищали посредством LH-20 с выходом **Соединения 68**, которое затем применяли для реакции с пептидными антигенами с выходом различных типов пептидных антигенных конъюгатов, например, $p\{[(HPMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}b\text{-}Ala\text{-}2B)]\text{-}b\text{-}p(HPMA)\}\text{-}DSCO\text{-}(Пептидный\ антиген)$, которые полностью описаны ниже.

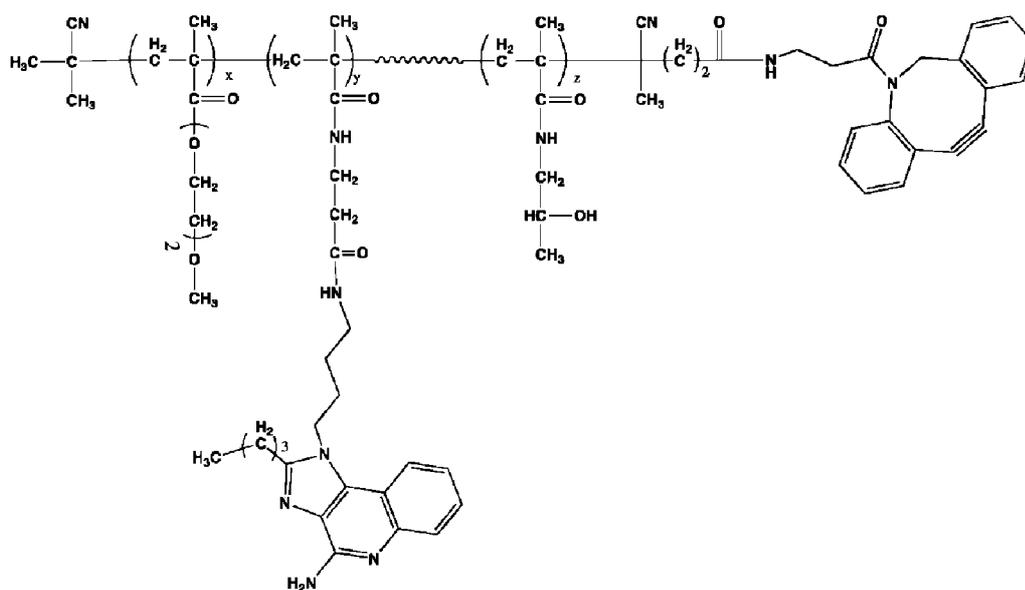
[00562] **Соединение 69**



[00563] **Соединение 69**, также именуемое как (HPMA-NHNNH-2BXy)-b-(HPMA)-DSCO или $p\{[(HPMA)\text{-}co\text{-}(MA\text{-}Acap\text{-}NHN\text{=}CH\text{-}2BXy)]\text{-}b\text{-}p(HPMA)\}\text{-}DSCO$. Мицеллообразующий диблок-сополимер (тип А-В) продуцировали полимеризацией RAFT в два этапа синтеза с применением предшественников HPMA и MA-Acap-NHNNH-Вос, полученных, как описано выше (см. Линн Г.М., и др. *Nat Biotechnol* 33(11): 1201-1210, 2015), а также 2-Циано-2-пропилбензодитиоата («СТА-АВІН», Сигма-Олдрич), Азобисизобутиронитрила («АІВН, Сигма-Олдрич»), **Соединения 60** и **Соединения 66**.

Гидрофобный блок А получали сополимеризацией HPMA с МА-Асар-NHNNH-Вос с применением СТА-AIBN, в качестве агента передачи цепи, и AIBN, в качестве инициатора, при температуре 70° С в течение 16 часов в смеси трет-бутиловый спирт/DMSO. Гидрофобный блок В впоследствии подвергали полимеризации с удлинением цепи посредством механизма RAFT путем добавления HPMA в присутствии AIBN при температуре 70° С в течение дополнительных 16 часов. Диблок-сополимер А-В, $p\{[(\text{HPMA})\text{-co-}(\text{МА-Асар-NHN}=\text{CH-2ВХу})]\text{-b-}p(\text{HPMA})\}\text{-DTB}$, выделяли осаждением, а затем снимали защиту Вос в 30% трифторуксусной кислоты TFA/DCM. TFA/DCM удаляли в вакууме, и затем группу DTB на одном конце сополимера заменяли посредством проведения реакции с **Соединением 66** при температуре 80° С в течение 2 часов в DMSO, после чего добавляли **Соединение 60**. Продукт осаждали и затем очищали посредством LH-20 с выходом **Соединения 69**, которое затем применяли для реакции с пептидными антигенами с выходом различных типов пептидных антигенных конъюгатов, например, $p\{[(\text{HPMA})\text{-co-}(\text{МА-b-Ala-2В})]\text{-b-}p(\text{HPMA})\}\text{-DВСО}$ - (Пептидный антиген), которые полностью описаны ниже.

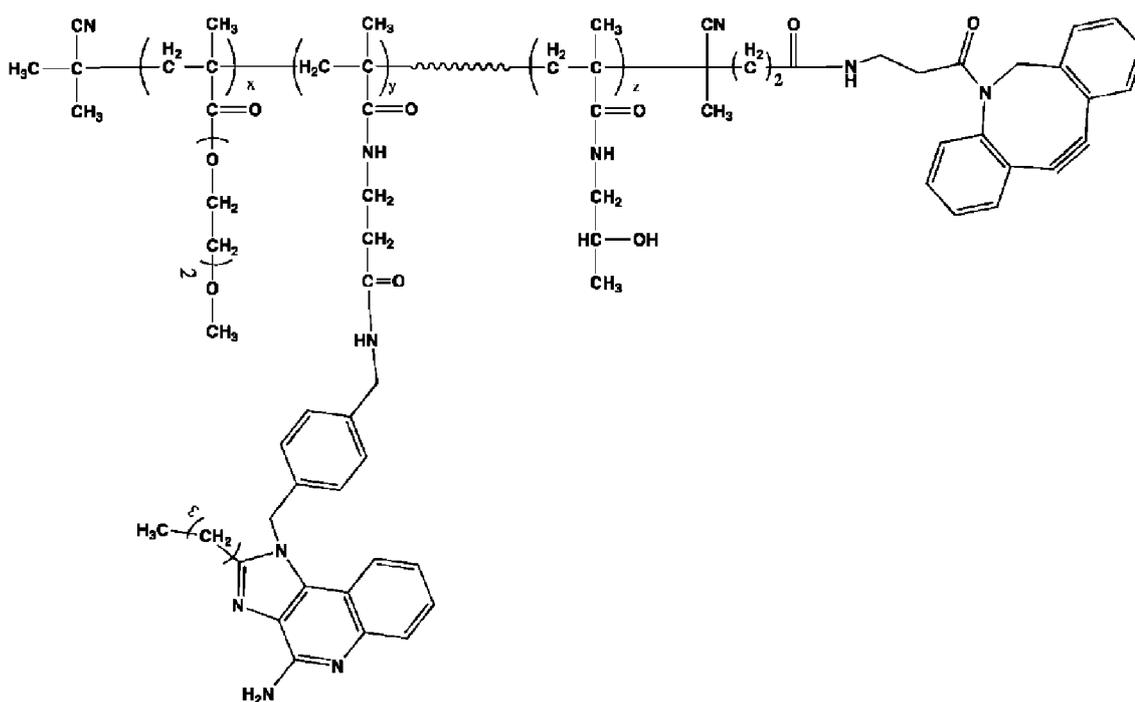
[00564] **Соединение 70**



[00565] **Соединение 70**, также обозначаемое как (DEGMA-2B)-b-(HPMA)-DVSО или $p\{[(\text{DEGMA})\text{-co-}(\text{МА-b-Ala-2В})]\text{-b-}p(\text{HPMA})\}\text{-DVSО}$. Чувствительный к температуре мицеллообразующий диблок-сополимер (тип А-В) продуцировали полимеризацией RAFT в два этапа синтеза с применением предшественников DEGMA, HPMA и МА-b-Ala-TT, полученных, как описано выше (см. Линн Г.М., и др. *Nat Biotechnol* 33(11): 1201-1210, 2015), а также 2-Циано-2-пропилбензодитиоата («СТА-АВІN», Сигма-Олдрич), Азобисизобутиронитрила («AIBN, Сигма-Олдрич»), **Соединения 1** и **Соединения 66**.

Чувствительный к температуре гидрофобный блок А получали сополимеризацией DEGMA с MA-b-Ala-TT с применением СТА-AIBN в качестве агента передачи цепи и AIBN в качестве инициатора при температуре 70° С в течение 16 часов в смеси трет-бутиловый спирт/DMSO. Гидрофобный блок В впоследствии подвергали полимеризации с удлинением цепи посредством механизма RAFT путем добавления HPMA в присутствии AIBN при температуре 70° С в течение дополнительных 16 часов. Диблок-сополимер А-В, $p\{[(\text{DEGMA})\text{-co-(MA-b-Ala-2B)}]\text{-b-p(HPMA)}\}$ -DTB, выделяли осаждением с выходом зеленого твердого вещества. Группу DTB на одном конце сополимера заменяли посредством проведения реакции с **Соединением 66** при температуре 80° С в течение 2 часов в DMSO, после чего добавляли **Соединение 1**. Продукт осаждали и затем очищали посредством LH-20 с выходом **Соединения 70**, которое затем применяли для реакции с пептидными антигенами с выходом различных типов пептидных антигенных конъюгатов, например, $p\{[(\text{DEGMA})\text{-co-(MA-b-Ala-2B)}]\text{-b-p(HPMA)}\}$ -DBCO-(Пептидный антиген), которые полностью описаны ниже.

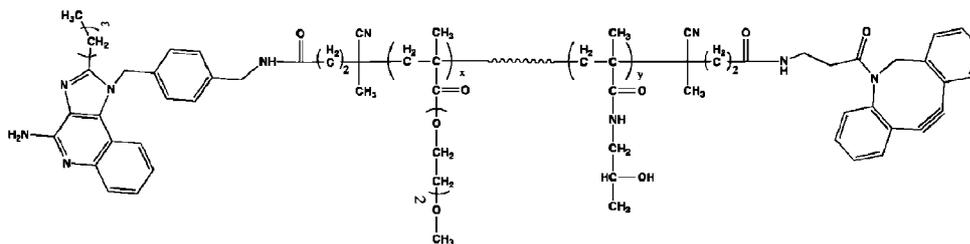
[00566] **Соединение 71**



[00567] **Соединение 71**, также именуемое как (DEGMA-2BХу)-b-(HPMA)-DBCO или $p\{[(\text{DEGMA})\text{-co-(MA-b-Ala-2BХу)}]\text{-b-p(HPMA)}\}$ -DBCO, получали с применением такой же процедуры, которая описана для **Соединения 70**, за исключением того факта, что **Соединение 2** применяли в качестве Лиганда. Продукт осаждали и затем очищали посредством LH-20 с выходом **Соединения 68**, которое затем применяли для реакции с пептидными антигенами с выходом различных типов пептидных антигенных конъюгатов,

например, $p\{[(\text{DEGMA})\text{-co-(MA-b-Ala-2BXy)}]\text{-b-p(HPMA)}\}\text{-DBCO}$ - (Пептидный антиген), которые полностью описаны ниже.

[00568] **Соединение 72**



[00569] **Соединение 72**, также именуемое как 2BXy-DEGMA-b-HPMA-DBCO. Мицеллообразующий диблок-сополимер (тип А-В) продуцировали полимеризацией RAFT в два этапа синтеза с применением предшественников DEGMA, HPMA, **Соединения 63**, **Соединения 65** и **Соединения 66**. Гидрофобный блок А получали сополимеризацией DEGMA с применением **Соединения 63** в качестве агента передачи цепи и **Соединения 65** в качестве инициатора при температуре 70° С в течение 16 часов в смеси трет-бутиловый спирт/DMSO. Гидрофобный блок В впоследствии подвергали полимеризации с удлинением цепи посредством механизма RAFT путем добавления HPMA в присутствии AIBN при температуре 70° С в течение дополнительных 16 часов. Диблок-сополимер А-В, 2BXy-[p(DEGMA)-b-p(HPMA)]-DTB, выделяли осаждением, и

группу DTB на одном конце сополимера заменяли посредством проведения реакции с **Соединением 66** при температуре 80° С в течение 2 часов в DMSO. Продукт осаждали и затем очищали посредством LH-20 с выходом **Соединения 72**, которое затем применяли для реакции с пептидными антигенами с выходом различных типов пептидных антигенных конъюгатов, например, 2BXy-p[(DEGMA)-b-p(HPMA)]-DBCO-(Пептидный антиген), которые полностью описаны ниже.

Пример 2: Реакция фрагмента пептидного антигена и гидрофобной молекулы (Н) с продуцированием пептидного антигенного конъюгата.

[00570] Фрагмент пептидного антигена, состоящий из пептидного антигена (А), необязательной заряженной молекулы (С), необязательных удлинений (В1 и/или В2) и предшественника линкера X1, например, [C]-[B1]-A-[B2]-X1, где [] обозначает, что группа является необязательной в этом примере, может реагировать с X2, сцепленным с гидрофобной молекулой (Н), например, X2-Н, с получением пептидного антигенного конъюгата, например, [C]-[B1]-A-[B2]-L-Н. При этом, фрагмент пептидного антигена содержит предшественник линкера X1, содержащий азид, например, азидо-лизин (Lys(N3)), иногда именуемый как K', фрагмент пептидного антигена может вступать в реакцию с предшественником линкера X2, содержащим алкин, такой как, DBCO, который

сцеплен с гидрофобной молекулой (Н) с образованием триазольного Линкера (L). В качестве неограничивающих примеров, **Соединения 3-5** представляют собой примеры гидрофобных молекул (Н) Формулы I, несущих предшественник линкера X2 с DBCO, который дополнительно сцеплен с Адьювантами Формулы III (то есть, TLR-7/8a); **Соединения 6-11** представляют собой примеры гидрофобных молекул (Н) Формулы I, несущих предшественник линкера X2 с DBCO, который дополнительно сцеплен с Адьювантами Формулы III (то есть, TLR-7/8a); и **Соединения 10-11** представляют собой примеры гидрофобных молекул (Н) Формулы II, несущих предшественник линкера X2 с DBCO, но не содержащих Лиганд с адьювантными свойствами.

[00571] Неограничивающий пример, показанный на **Фигуре 2**, представляет собой реакцию гидрофобной молекулы (Н), сцепленной с предшественником линкера X2, содержащим DBCO, который вступает в реакцию в молярном соотношении 1,1:1 с фрагментом пептидного антигена, содержащим азид, несущий предшественника линкера X1. Как указано в хроматограмме ВЭЖХ, DBCO на гидрофобной молекуле (Н) вступает в реакцию с предшественником линкера X1, содержащим азид, что приводит к образованию триазольного Линкера (L), который сцеплен с удлинением В2, которое сцеплено с пептидным антигеном (А), который сцеплен с удлинением В1, которое сцеплено с заряженной молекулой (С), соединяя, таким образом, пептидный антиген (А) с гидрофобной молекулой (Н) для получения пептидного антигенного конъюгата. Сотни примеров различных пептидных антигенных конъюгатов, образованных в результате реакции между фрагментом пептидного антигена, несущим азид, и гидрофобной молекулой (Н), несущей DBCO, описаны повсеместно. Поскольку реакция азидов и DBCO является надежной и последовательной для всех продуцируемых пептидных антигенных конъюгатов, то полное описание реакции, применяемой для образования конъюгатов, а также их характеристики не предложены. Примечание: молекулярная масса пептидных антигенных конъюгатов, возникающих в результате циклоприсоединения, представляет собой сумму массы исходных материалов.

[00572] При этом, фрагмент пептидного антигена содержит предшественник линкера X1, содержащий тиол, например, цистеин (Cys), иногда именуемый как С, фрагмент пептидного антигена может вступать в реакцию с гидрофобной молекулой (Н), несущей предшественник линкера X2, содержащий малеимид, например, **Соединение 21**, в результате чего образуется Линкер (L) на основе тиоэфира. При этом, фрагмент пептидного антигена содержит предшественник линкера X1, содержащий амин, например, Лизин (Lys), иногда именуемый как К, фрагмент пептидного антигена может вступать в реакцию с гидрофобной молекулой (Н), несущей предшественник линкера X2,

содержащий активированный эфир, такой как, NHS, например, **Соединение 22**, в результате чего образуется амидная связь.

Пример 3: Синтез и биологическая характеристика пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV

[00573] В предыдущих исследованиях сообщалось о доставке Т-клеточных эпитопов в виде ~ 20-40 аминокислотных синтетических «длинных» пептидов (SLP или LP) в комбинации с различными адъювантами вакцин в качестве средства для индукции CD8 Т-клеточных ответов. Однако влияние длины пептида и гидродинамического поведения, а также совместной доставки пептида с иммуностимуляторами, такими как, TLRa, на иммуногенность изучено недостаточно. Чтобы лучше понять, как различные параметры антигенов на основе пептидов влияют на Т-клеточный иммунитет, мы систематически оценивали, как различные свойства пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV, описанных в настоящем документе, влияют на CD4 и CD8 Т-клеточные ответы *in vivo*.

Влияние гидродинамического поведения пептидного антигена, длины пептидного антигена (A) и совместной доставки TLR-7/8a на CD8 Т-клеточные ответы

[00574] Априори не было ясно, как длина пептидного антигена (A), доставляемого в виде пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению, будет влиять на иммуногенность, в частности, на интенсивность и качество генерируемого CD8 и/или CD4 Т-клеточного ответа.

[00575] Чтобы систематически исследовать, как длина пептидного антигена (A) влияет на иммуногенность пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV, в качестве пептидных антигенных конъюгатов продуцировали две модели неоантигенных CD8 Т-клеточных эпитопов, Irgq и Cpne1, полученных из модели опухоли мыши, MC38, при этом, пептидные антигены (A) представляли собой либо синтетический длинный пептид из 26 аминокислот (SLP или «LP»), либо минимальный эпитоп из 10 аминокислот (ME или «Min») (**Фигура 4**). Пептидные антигены (A) на основе SLP были сцеплены на С-конце с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который был сцеплен с предшественником линкера X2, DBCO, который был сцеплен с N-концом гидрофобной молекулы (H); тогда как пептидные антигены (A) с минимальными эпитопами были сцеплены с С-концевым удлинением (B2), которое было сцеплено с предшественником линкера X2, DBCO, который был сцеплен с N-концом гидрофобной молекулы (H) для генерирования пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV, приведенных в обобщенном виде на **Фигуре 4**.

[00576] Общая схема синтеза пептидных антигенных конъюгатов представляла собой реакцию 1,0 эквивалента фрагмента пептидного антигена, несущего химически активный азид, с 1,2 эквивалентами гидрофобной молекулы (Н), несущей DBCO, в DMSO при комнатной температуре. Реакцию завершили через 24 часа, и дополнительная очистка не потребовалась.

[00577] Сначала мы оценивали гидродинамическое поведение пептидных антигенов (А) и пептидных антигенных конъюгатов (**Фигура 4**). Примечательно, что пептидные антигены (А), содержащие минимальные эпитопы (Min) и LP как из Irgq, так и из Crpe1, оказались растворимыми в воде до концентрации 0,1 мг/мл, однако, присоединение пептидных антигенов (А) к любой из двух гидрофобных молекул (Н), W₃ или 2ВХу₃, привело к тому, что полученные в результате пептидные антигенные конъюгаты претерпевали образование частиц, за исключением пептидного антигенного конъюгата, доставляющего пептидный антиген (А), содержащий LP из Crpe1, присоединенного к W₃. Эти результаты показывают, что пептидные антигенные конъюгаты Формулы IV индуцируют образование частиц растворимых в воде пептидов, и что увеличение длины гидрофобной молекулы (Н) или применение большего количества гидрофобных мономеров (например, Glu(2ВХу), по сравнению с Триптофаном) повышает надежность образования частиц.

[00578] Соответственно, неожиданно было обнаружено, что большинство тестируемых пептидных антигенных конъюгатов образовывали частицы, когда гидрофобная молекула (Н) Формулы I состояла из, по меньшей мере, 5 мономерных звеньев, сцепленных с адъювантами Формулы III, тогда как гидрофобные молекулы (Н) Формулы I или II с количеством мономерных звеньев менее 5, например, 1 или 3 мономерных звена, менее надежно индуцировали образование частиц. На основании этих данных, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобные молекулы (Н), применяемые в пептидных антигенных конъюгатах, состоят из, по меньшей мере, 5 мономерных звеньев для обеспечения образования частиц высокогидрофильных и/или заряженных пептидных антигенов (А). Хотя, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрофобная молекула (Н) может иметь в длину, по меньшей мере, 3 мономерных звена, например, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 мономерных звеньев, обычно до, примерно, 300 мономерных звеньев.

[00579] Далее мы оценивали, как гидродинамическое поведение пептидного антигенного конъюгата, а также длина пептидного антигена (А) и совместная доставка адъюванта TLR-7/8a, содержащего пептидный антигенный конъюгат, влияет на иммуногенность *in vivo*. Пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные

антигены (A), состоящие либо из длинных пептидов (LP) из 26 аминокислот, либо из минимальных эпитопов (Min) из 10 аминокислот, либо были смешаны с малой молекулой TLR-7/8a, **Соединением 2**, именуемым как 2ВХу; сцеплены с гидрофобной молекулой (H), W₃ и смешаны с 2ВХу; либо пептидные антигены (A) были сцеплены с гидрофобной молекулой (H), 2ВХу₃, которая образует частицы и обеспечивает совместную доставку пептидного антигена (A) с адъювантом TLR-7/8a (см. **Фигуры 4-6**). Мыши, иммунизированные пептидными антигенными конъюгатами, доставляющими пептидные антигены (A), состоящие из минимальных эпитопов, сцепленных с гидрофобной молекулой (H), 2ВХу₃, предлагали CD8 Т-клеточные ответы наибольшей интенсивности (> 1% IFN γ ⁺ CD8 Т-клеток от общего числа) после однократной иммунизации, а это указывает на тот факт, что совместная доставка минимального эпитопа с TLR-7/8a в формате частиц является эффективным подходом для выработки CD8 Т-клеточных ответов. Примечательно, что растворимый минимальный эпитоп и растворимый LP, смешанный с TLR-7/8a, индуцировали самые низкие CD8 Т-клеточные ответы, которые не были статистически значимыми, по сравнению с наивными группами, а это указывает на тот факт, что растворимая форма пептидного антигена (A) является наименее иммуногенной (**Фигуры 5 и 6**). Наконец, в то время как пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (A), состоящие из минимальных эпитопов Irgq или LP из Irgq, сцепленных с гидрофобной молекулой (H), 2ВХу₃, предлагали сопоставимую интенсивность CD8 Т-клеточных ответов, пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (A), состоящие из минимального эпитопа Cppe1, индуцировали почти 10-кратное увеличение CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, доставляющими Cppe1 в качестве LP.

[00580] Для дальнейшего изучения роли длины пептидного антигена (A) в иммуногенности для стимуляции CD4 и CD8 Т-клеточного иммунитета для пептидных антигенных конъюгатов **Формулы IV**, 7 прогнозируемых минимальных эпитопов CD8 Т-клеток (то есть, прогнозируемых неоантигенов), полученных из модели опухоли мыши В16, доставляли либо в виде длинных пептидов (LP) из 27 аминокислот, либо в виде минимальных эпитопов из 10 аминокислот (именуемых как ME или Min) в качестве пептидных антигенов (A), содержащих пептидные антигенные конъюгаты **Формулы IV** (см. **Фигуру 7**). Пептидные антигены (A) на основе LP были сцеплены на С-конце с предшественником линкера X1, азидо-лизином (K'), который был сцеплен с предшественником линкера X2, DBCO, который был сцеплен с N-концом гидрофобной молекулы (H); тогда как пептидные антигены (A) с минимальными эпитопами были

сцеплены с С-концевым удлинением (B2), которое было сцеплено с предшественником линкера X2, DBCO, который был сцеплен с N-концом гидрофобной молекулы (H) для генерирования пептидных антигенных конъюгатов **Формулы IV**, приведенных в обобщенном виде на **Фигуре 7**. Пептидные антигены (A) были сцеплены либо с 2ВХу₅, либо с 2В₅ гидрофобными молекулами (H) с образованием пептидных антигенных конъюгатов. Сравнение 2ВХу₅ с 2В₅, которые структурно схожи, но отличаются активностью в отношении TLR-7, позволило оценить, как воспаление влияет на иммуногенность. Мышей иммунизировали иммуногенными композициями, состоящими из пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих пептидные антигены (A) в виде минимальных эпитопов (Min), LP или как в виде минимальных эпитопов, так и в виде LP. Интенсивность CD4 и CD8 Т-клеточных ответов оценивали через 2 недели после 2 иммунизаций (**Фигура 8**).

[00581] Поразительным и неожиданным результатом было тот факт, что мыши, которые получали пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (A), содержащие минимальные эпитопы («Min»), индуцировали CD8 Т-клеточные ответы наивысшей интенсивности, тогда как пептидные антигенные конъюгаты доставляли пептидные антигены (A), содержащие LP, индуцировали CD8 Т-клеточные ответы более низкого уровня. Эта тенденция была очевидна для обеих гидрофобных молекул (H), 2ВХу₅ и 2В₅. Соответственно, для пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих пептидный антиген (A), содержащий LP, сцепленный с гидрофобной молекулой (H), 2ВХу₅, CD8 Т-клеточные ответы составляли ~ 0,35%, а CD4 Т-клеточные ответы составляли ~ 0,25% (**Фигура 8**). Напротив, для группы мышей, которые получали пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидный антиген (A), содержащий минимальный эпитоп, сцепленный с гидрофобной молекулой, 2ВХу₅, CD8 Т-клеточные ответы составляли ~ 1,9%, а CD4 Т-клеточные ответы составляли ~ 0,1 %, что предлагало, примерно, 6-кратное увеличение CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, доставляющими LP, но неопределяемые CD4 Т-клеточные ответы. В группе мышей, которые получали пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (A), содержащие как минимальный эпитоп, так и LP («LP + min»), CD8 Т-клеточные ответы составляли ~ 0,6%, а CD4 Т-клеточные ответы составляли ~ 0,5 %, что предлагало баланс как CD4, так и CD8 Т-клеток (**Фигура 8**).

[00582] Аналогичная тенденция наблюдалась для пептидных антигенных конъюгатов с применением гидрофобной молекулы (H) 2В₅, которая включает менее активный агонист TLR-7/8, 2В, по сравнению с гидрофобной молекулой (H), 2ВХу₅, которая включает 2ВХу. Соответственно, в группе, которая получала пептидные

антигенные конъюгаты, которые включали гидрофобную молекулу (Н) 2В₅ и пептидные антигены (А), содержащие LP, были определены CD8 Т-клеточные ответы при ~ 1,0% и CD4 Т-клеточные ответы при ~ 0,75%, тогда как в группе, которая получала пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (А), содержащие только Min, наблюдались CD8 Т-клеточные ответы при ~ 4,5% и CD4 Т-клеточные ответы при ~ 0,1%, наблюдалось почти 4-кратное увеличение CD8 Т-клеточных ответов, но CD4 Т-клеточные ответы были неопределяемыми. В группе, которая получала вакцину, которая содержала пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (А), содержащие минимальный эпитоп и LP, сцепленный с гидрофобной молекулой (Н) 2В₅, CD8 Т-клеточные ответы составляли ~ 2,2%, а CD4 Т-клеточные ответы составляли ~ 0,95% (Фигура 8).

[00583] Подводя итог вышесказанному, следует отметить, что применение ME (или «Min») в качестве пептидного антигена (А) пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV привело к неожиданному и значительному увеличению CD8 Т-клеточного ответа, по сравнению с пептидным антигеном (А), содержащим LP. Однако это также привело к уменьшению CD4 Т-клеточных ответов. Важен тот факт, что включение пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих LP и Min в качестве пептидных антигенов (А), в иммуногенные композиции, вводимые мышам, приводило к восстановлению CD4 Т-клеточного ответа и неожиданно более высокому CD8 Т-клеточному ответу, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, доставляющими пептидные антигены (А), состоящие только из LP. Другим ключевым результатом был тот факт, что обширность воспаления оказала заметное влияние на иммуногенность. Гидрофобная молекула (Н), 2В₅, содержит TLR-7/8a, **Соединение 1**, которое почти в 10 раз менее активно, чем **Соединение 2**, 2ВХу, доставляемое на гидрофобной молекуле (Н), 2ВХу₅. Таким образом, почти 3-4-кратное увеличение CD4 и CD8 Т-клеточных ответов на пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобную молекулу (Н), 2В₅, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, которые применяют 2ВХу₅, позволяет предположить, что уменьшение обширности воспаления за счет модуляции адъювантной активности может быть предпочтительным для достижения оптимального уровня иммуногенности пептидными антигенными конъюгатами по настоящему изобретению. Действительно, при скрининге иммуногенности 40 различных неоантигенов на основе пептидов, полученных из линии опухолевых клеток мыши МС38, индивидуализированные противораковые вакцины на основе пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих пептидные антигены (А), состоящие из минимальных эпитопов, сцепленных с гидрофобной молекулой (Н), 2В₅, привели к 6-кратному

улучшению широты достигнутых CD8 T-клеточных ответов, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, состоящими из минимальных эпитопов, сцепленных с гидрофобной молекулой (H), 2BX_y5 (**Фигура 9**).

[00584] Дополнительный неожиданный результат относился к исследованиями, направленными на идентификацию оптимальных механизмов дозирования нескольких различных T-клеточных эпитопов в качестве пептидных антигенных конъюгатов. Согласно предыдущим исследованиям, дозирование нескольких T-клеточных эпитопов в одном и том же сайте, которые связывают одну и ту же молекулу МНС, может конкурировать со связыванием с молекулами МНС на APC, а также это может привести к конкуренции с презентацией T-клеткам, что тем самым снижает интенсивность T-клеточных ответов на эпитопы, доставляемые вместе, по сравнению с эпитопами, доставляемыми отдельно в виде одиночного эпитопа, на сайт иммунизации. Хотя мы наблюдали, что введение иммуногенных композиций, включая пептидные антигенные конъюгаты, содержащие одиночный эпитоп, мышам привело к более высокой интенсивности T-клеточного ответа на этот эпитоп, по сравнению с совместным введением одного и того же эпитопа с 3 разными пептидными антигенными конъюгатами, содержащими разные эпитопы, все из которых связывают ту же молекулу МНС либо на 1, либо на 4 сайтах (**Фигура 10**), однако было неожиданно установлено, что доставка тех же 4 эпитопов 4 отдельным сайтам (то есть, 1 уникальный эпитоп на сайт) у одного и того же животного привела к более низким уровням ответов, чем доставка всех 4 эпитопов вместе 4 сайтам (**Фигура 10**). Это было неожиданно и парадоксально для нынешней парадигмы, которая предполагает, что лучше дозировать несколько эпитопов на разных сайтах, чтобы избежать конкуренции между эпитопами, чем доставлять несколько эпитопов вместе на несколько сайтов. Эти данные предполагают новую парадигму доставки нескольких различных эпитопов на основе максимального увеличения количества сайтов, куда вводят каждый эпитоп. Следовательно, в предпочтительных вариантах осуществления способов индуцирования иммунного ответа по настоящему изобретению, иммуногенные композиции, содержащие несколько различных пептидных антигенов (A), дозируют на несколько сайтов, чтобы максимально увеличить иммунный ответ.

Пример 3: пептидные антигенные конъюгаты Формулы V

[00585] Предыдущие данные демонстрируют, как параметры пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV влияют на иммуногенность. Эти данные показывают, что пептидные антигенные конъюгаты, которые обеспечивают совместную доставку пептидных антигенов (A) с TLR-7/8a в частицах, являются предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения в отношении индуцирования CD8 T-

клеточного иммунитета. Ограничение пептидных антигенных конъюгатов Формулы IV состоит в том, что частицы, образованные в соответствии с этим подходом, могут иметь переменный размер и стабильность, вследствие изменчивости композиции пептидных антигенов (А), сцепленных с гидрофобными молекулами (Н). Одним из возможных механизмов стабилизации частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, является введение поверхностного заряда, который предотвращает агрегацию частиц и стабилизирует частицы, образованные пептидными антигенными конъюгатами, в водных средах.

[00586] Пептидные антигенные конъюгаты Формулы V позволяют формировать стабильные частицы определенного размера путем присоединения заряженной молекулы (С) к пептидному антигену (А), который сцеплен с гидрофобной молекулой (Н) (**Фигура 11**). Однако непосредственное конъюгирование заряженной молекулы (С) и/или гидрофобной молекулы (Н), непосредственно примыкающей к пептидному антигену (А), может вызвать вмешательство в процессинг и презентирование механизма APC, который позволяет презентировать минимальные эпитопы в контексте МНС-I и МНС-II. Таким образом, для того, чтобы обеспечить эффективный процессинг пептидных антигенов (А) на основе минимальных эпитопов (Min) или LP, доставляемых с применением пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, мы оценили применение разлагаемых ферментами удлинений (В1 и В2), сцепляющих пептидный антиген (А) с заряженной молекулой (С) и гидрофобной молекулой (Н) на N- и C-концах, соответственно (**Фигура 11**).

[00587] Для того, чтобы оценить влияние удлинений (В1 и В2) на процессинг минимальных CD8 Т-клеточных эпитопов из пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, мы синтезировали серию пептидов, при этом, заряженная молекула (С) была сцеплена с необязательным удлинением (В1) на N-конце минимального эпитопа, Cppe1, который был сцеплен с необязательным удлинением (В2) на C-конце с предшественником линкера X1 (Lys(N3)), и оценивали, как заряженная молекула (С) и удлинения (В1 и/или В2) влияли на активность пептидных антигенов (А) *in vitro* в отношении активации Cppe1-специфических CD8 Т-клеток. Как показано на **Фигуре 12**, пептидные последовательности получали с применением расщепляемых катепсином удлинений или комбинированных расщепляемых катепсином и иммунопротеасомальных удлинений, либо на одном, либо на обоих N- и C-концах (В1 и/или В2) минимальных эпитопов. Эти последовательности пептидного антигена (А), сцепленные с удлинениями (В1 и/или В2), добавляли в культуры спленоцитов в различных концентрациях для оценки эффективности различных конструкций для стимулирования поглощения и презентации минимального эпитопа, Cppe1, посредством APC.

[00588] Как и ожидалось, минимальный эпитоп (■, **Фигура 12**), который не требует процессинга и может быть непосредственно загружен в контексте МНС-I и презентируется для APC, был наиболее эффективным и обеспечивал самую высокую активность (самый низкий уровень EC50) *in vitro*. Однако добавление заряженной молекулы (C) (Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys SEQ ID NO: 71) непосредственно к N-концу минимального эпитопа (◆) без применения разлагаемого удлинения (B1) привело к почти 10000-кратному снижению активности, по сравнению с минимальным эпитопом, применяемым отдельно. Примечательно, что активность минимального эпитопа была восстановлена простым помещением разлагаемого ферментами удлиненного тетрапептида (B1) (то есть, Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 7) между заряженной молекулой (C) и минимальным эпитопом (Гексагоны, **Фигура 12**). Размещение дополнительного расщепляемого катепсином удлинения (B2) на C-конце (то есть, Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 7) или объединение разлагаемой иммунопротеасомой последовательности с расщепляемым катепсином удлинением на N-конце (B1) (Ser-Leu-Val-Arg-Tyr-Leu-Leu-Leu SEQ ID NO: 72) или на C-конце (B2) (Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 13) имели минимальное дополнительное влияние на активность, по сравнению с применением удлинения одиночного тетрапептида (B1) между заряженной молекулой (C) и пептидным антигеном (A) с минимальным эпитопом.

[00589] В следующих исследованиях, была предпринята попытка оценить влияние разлагаемых ферментами удлинений (B1 и B2) на эффективность кросс-презентации антигенов *in vivo* с применением пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, при этом, гидрофобная молекула (H) представляла собой 2BX₃.

[00590] Общая схема синтеза пептидных антигенных конъюгатов Формулы V представляла собой реакцию 1,0 эквивалента пептидного антигена, несущего химически активный азид, с 1,2 эквивалентами гидрофобной молекулы (H), несущей DBCO, в DMSO при комнатной температуре. Реакцию завершили через 24 часа, и дополнительная очистка не потребовалась.

[00591] Как показано на **Фигуре 13**, пептидные антигенные конъюгаты были синтезированы с различными заряженными молекулами (C) (например, Lys-Ser-Lys-Ser-Lys-Ser SEQ ID NO: 73, Glu-Ser-Glu-Ser-Glu-Ser SEQ ID NO: 74 и Glu-Lys-Glu-Lys-Glu-Lys SEQ ID NO: 71) с применением различных комбинаций разлагаемых ферментами удлинений на N- и C-концах (B1 и B2) минимального эпитопа, Cppe1. Мышей вакцинировали различными иммуногенными композициями, представленными на **Фигуре 13**, в дни 0 и 14, и Т-клеточные ответы оценивали относительно цельной крови в дни 10

(Фигура 14А) и 28 (Фигура 14В). В соответствии с данными *in vitro*, показанными на Фигуре 12, помещение любой из трех заряженных молекул (С) на N-конце минимального эпитопа, без применения удлинения В1, привело к полной отмене CD8 Т-клеточных ответов (~ 0,1% IFN- γ + суммарный CD8 + Т-клетки) после оценки ответов относительно цельной крови животных, примированных однократной иммунизацией (Фигура 14). Однако помещение расщепляемого катепсином удлинения (В1) между заряженной молекулой (С) и N-концом пептидного антигена (А), состоящего из минимального эпитопа, привело к почти 10-кратному увеличению CD8 Т-клеточных ответов пептидных антигенных конъюгатов с применением положительно заряженной молекулы (С) (Lys-Ser-Lys-Ser-Lys-Ser SEQ ID NO: 73) и к умеренному улучшению CD8 Т-клеточных ответов на пептидные антигенные конъюгаты с заряженными молекулами (С) ES и EK (Фигура 14). Среди групп, вакцинированных пептидными антигенными конъюгатами, содержащими положительно заряженную молекулу (С) (Lys-Ser-Lys-Ser-Lys-Ser SEQ ID NO: 73), добавление как N-концевого, так и С-концевого удлинения, расщепляемого катепсином (В1 и В2), привело к CD8 Т-клеточным ответам на уровне, примерно, 3,5% после однократной иммунизации, в то время как добавление иммунопротеасомальных последовательностей в В1 и/или В2, в дополнение к расщепляемым катепсином последовательностям, привело лишь к умеренному дальнейшему увеличению интенсивности CD8 Т-клеточных ответов (Фигура 14). Тенденции были согласованы с данными после 2 иммунизаций для пептидных антигенных конъюгатов с применением всех 3 наборов заряженных молекул (С): включая N- и С-концевые расщепляемые катепсином удлинения (В1 и В2) между заряженной молекулой (С) и гидрофобными молекулами (Н), соответственно, что обычно приводило к ответам с наивысшей интенсивностью, практически без улучшения ответов путем добавления иммунопротеасомального линкера.

[00592] Эти данные иллюстрируют неожиданное открытие, заключающееся в том, что расщепляемое катепсином удлинение пептида (В1), например, Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7), помещенное на N-конце пептидных антигенов пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, представляет собой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения для стимулирования презентации антигена *in vitro* и перекрестного примирования CD8 Т-клеток *in vivo*. Умеренные дополнительные улучшения в CD8 Т-клеточных ответах наблюдались, когда расщепляемые катепсином удлинения пептида были помещены как на N-, так и на С-концах, и когда расщепляемое катепсином удлинение (В2) на С-конце, было объединено с последовательностью, которая дополнительно отдает предпочтение иммунопротеасомному процессингу (например,

дипептид Gly-Gly, of Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg SEQ ID NO: 13). Таким образом, предпочтительные варианты осуществления пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению включают расщепляемое катепсином удлинение (B1) между N-концом пептидного антигена (A) и любыми дополнительными компонентами, например, заряженными молекулами (C); и, необязательно, расщепляемое катепсином или объединенное расщепляемое катепсином и разлагаемое иммуннопротеасомой удлинение (B2) на C-конце.

[00593] Чтобы расширить эти результаты, мы синтезировали пептидные антигенные конъюгаты с различными комбинациями и композициями разлагаемых катепсином удлинений на N- и C-концах (B1 и B2) минимального эпитопа, Adpgk (**Фигура 15**). Различные композиции пептидов, показанные на **Фигуре 15**, были добавлены в культуры спленцитов в различных концентрациях для оценки эффективности различных конструкций для стимулирования поглощения и презентации минимального эпитопа, Adpgk, посредством APC. Определяемая *in vitro* активность (EC50) для пептидного антигена Adpgk, с различными комбинациями и композициями разлагаемых катепсином удлинений на N- и C-концах (B1 и B2), показана на **Фигуре 16**. Для подтверждения результатов *in vitro*, подмножество последовательностей, основанных на формуле C-B1-A-B2-X1, показанных на **Фигуре 15**, были сцеплены с гидрофобной молекулой (H), 2B₃W₂, и затем ее вводили мышам. CD8 T-клеточные ответы оценивали на день 13 (фигура 17) и согласовывали с результатами скрининга *in vitro*, подтверждая, что разлагаемые катепсином удлинения, сцепляющие пептидный антиген (A) с заряженной молекулой (C) и гидрофобной молекулой (H) на N- и C-концах, соответственно, могут привести к улучшению презентации антигена *in vitro*, а также к повышению эффективности кросс-презентации антигенов *in vivo*.

Влияние суммарного заряда и удлинений последовательности (B1 и B2) на размер частиц

[00594] То, что поверхностный заряд частиц влияет на их стабильность в растворе – хорошо известно, однако влияние плотности заряда и суммарного заряда пептидных антигенных конъюгатов на размер и стабильность надмолекулярных ассоциатов этих пептидных антигенных конъюгатов в водных растворах изучено не достаточно хорошо.

[00595] Чтобы лучше понять, как плотность заряда и суммарный заряд амфифильных макромолекул влияют на гидродинамическое поведение самоскапливающихся частиц, мы синтезировали серию пептидных антигенных конъюгатов Формулы V (**Фигура18**) с различной композицией пептидных антигенов (A), заряженными молекулами (C), удлинениями (B1 и B2) и гидрофобными молекулами (H), и

оценивали, как эти параметры влияют на размер и стабильность частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, суспендированными в водных растворах при рН, примерно, 7,4 (**Фигура 18**).

[00596] Наши первоначальные исследования были направлены на изучение того, как увеличение суммарного заряда влияет на размер частиц и стабильность пептидных антигенных конъюгатов **Формулы V (Фигуры 18 и 19)**. Наши результаты показывают обратную зависимость между интенсивностью заряда и размером частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами **Формулы V**, доставляющими широкий спектр различных пептидных антигенов (A) (N=754), при этом, примерно, 90% пептидных антигенов (A), доставленных в виде пептидных антигенных конъюгатов **Формулы V** с суммарным зарядом (абсолютное значение) > 6, собирались в мицеллы наночастиц размером ~ 20-40 нм. Примечательно, что интенсивность суммарного заряда, необходимого для обеспечения мицеллообразования наночастиц, в большей степени зависит от длины и гидропатии пептидного антигена (A), при этом большинство пептидных антигенных конъюгатов доставляют пептидные антигены (A) на основе L, образующие мицеллы в виде пептидных антигенных конъюгатов с суммарным зарядом +8 или выше, или -8 или ниже, но с наиболее высокогидрофобными антигенами, для которых необходим суммарный заряд до +10 или выше, или -10, или ниже, чтобы обеспечить стабильное образование мицелл наночастиц.

[00597] Основная проблема для PCV на основе пептидов заключается в том, что они должны обеспечивать однородность состава с применением любого возможного пептидного антигена, который может возникнуть в результате генома человека. Чтобы оценить генерализуемость SP-7/8a в качестве PCV, мы сначала вычисляли распределение частоты заряда и гидропатии всех возможных пептидов из 25 аминокислот (11,3 г/моль 25-мерные), возникающих в результате канонических транскриптов, включая все возможные миссенс-мутации (72,6 г/моль 24-мерные). Неожиданно, наши результаты показывают, что более 98% из неоантигенов на основе пептидов из 25 аминокислот будут иметь заряд от -6 до +6 (при рН 7,4) и общее среднее значение гидропатии (GRAVY) между +2 и -2. Эти результаты указывают на то, что распределение заряда и гидропатии неоантигенов мыши, примененные в настоящем документе, представляет характеристики *in silico* прогнозируемых неоантигенов человека (**Фигура 19 C и D**). Примечательно, что даже умеренное увеличение от, примерно, 2 до 4 целочисленных единиц суммарного заряда приводит к заметно улучшенной стабильности частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами **Формулы V**. Соответственно, в то время как, примерно, по меньшей мере, 25% LP-неоантигенов доставляются в виде пептидных антигенных

конъюгатов Формулы V с суммарным зарядом +6, агрегированными, те же самые LP-неоантигены, доставляются в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V с суммарным зарядом, который больше или равен +8, скопившихся в стабильные мицеллы наночастиц (**Фигура 19 E**). Эти результаты показывают, что пептидные антигены Min и LP, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V с суммарным зарядом, который больше или равен +6 и +8 (или меньше, или равен -6 и -8), соответственно, надежно скапливаются в мицеллы наночастиц. Важно отметить, что эти неожиданные результаты свидетельствуют о том, что пептидные антигенные конъюгаты должны быть способны вмещать антигены (A) пептидов из 25 аминокислот с диапазоном заряда от, примерно, -6 до, примерно, +6, чтобы обеспечить применение достаточного суммарного заряда к 98% возможных неоантигенов с 25 аминокислотами; поэтому необходимо иметь, по меньшей мере, 13 уникальных комбинаций из заряженных молекул (C) и необязательных удлинений (B1 и/или B2), чтобы обеспечить добавление достаточного количества заряда (например, несущие 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 заряженных функциональных групп) пептидному антигену (A) для достижения необходимого суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата.

[00598] Чтобы более тщательно изучить тенденцию между суммарным зарядом пептидных антигенных конъюгатов и размером, и стабильностью частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами в водных буферах, мы исследовали взаимодействие между общим средним значением гидропатии (GRAVY) пептидной последовательности, содержащей пептидные антигенные конъюгаты (например, фрагмент пептидного антигена, включая заряженную молекулу на основе пептида (C), удлинения пептида (B1 и B2) и пептидный антиген (A)), а также размером и стабильностью образующихся частиц (**Фигура 19F**). Существовала сильная взаимозависимость между значением GRAVY, суммарным зарядом и размером частиц. Соответственно, многие из пептидных антигенных конъюгатов с суммарным зарядом +4 и общим средним значением гидропатии (GRAVY) меньше 0 образовывали стабильные частицы (**Фигура 19F**). Напротив, около 25% пептидных антигенных конъюгатов с суммарным зарядом +4 и значением GRAVY, превышающим 0, образовывали агрегаты, в то время как немногие пептидные антигенные конъюгаты с суммарным зарядом +6 и значением GRAVY, превышающими 0, образовывали агрегаты. Эти данные указывают на то, что в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, необходимо выбирать интенсивность суммарного заряда для компенсации значения GRAVY доставленного пептидного антигена (A). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, композицию заряженной молекулы (C) и удлинений (B1 и B2)

выбирают таким образом, чтобы предложить пептидные антигенные конъюгаты, суммарный заряд которых больше или равен +4, или меньше или равен -4, для стимуляции образования стабильных частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, суммарный заряд которых большее +6 или меньше -6, который применяется для обеспечения стабильного образования наночастиц даже в наибольшей степени гидрофобных пептидных антигенов (А) (**Фигура 19F**). Действительно, для высокогидрофобных антигенов на основе LP может потребоваться еще большее абсолютное значение суммарного заряда. Как таковые, пептидные антигенные конъюгаты должны иметь суммарный заряд, который: больше или равен +8, или меньше или равен -8, для LP-пептидных антигенов (А) со значением GRAVY менее 0,25; больше или равен +9, или меньше или равен -9, для LP-пептидных антигенов (А) со значением GRAVY, примерно, 0,25-0,75; и больше или равен +10, или меньше или равен -10, для LP-пептидных антигенов (А) со значением GRAVY более 0,75, при этом, LP применяется для обозначения пептидного антигена (А), который длиннее, чем минимальный эпитоп, например пептидный антиген, содержащий более 15 аминокислот, обычно, по меньшей мере, 20, например, 25 аминокислот.

[00599] Следует отметить, что наш анализ включал пептидные антигены с крайними значениями композиций, с точки зрения заряда и гидропатии. Соответственно, 3 уникальных пептидных антигена, представляющих в наибольшей степени, то есть, 90-й перцентиль или выше, гидрофобные (Val-Val-Ile-Ala-Ile-Phe-Ile-Ile-Leu (SEQ ID NO: 57)), положительно заряженные (Lys-Asn-His-Arg-Asn-Arg-Qln-Val-Ile SEQ ID NO: 75) и отрицательно заряженные (Ser-Pro-Glu-Arg-Asn-Asp-Trp-Glu-Pro-Leu SEQ ID NO: 76) - последовательности из 1377 прогнозируемых неоантигенов, взятых из 4 опухолевых клеточных линий мыши, а также подтвержденный CD8 Т-клеточный эпитоп (Ala-Ser-Met-Thr-Asn-Met-Glu-Leu-Met-Ser-Ser (SEQ ID NO: 2)), были выбраны для оценки. Пептидный антиген (А), содержащий подтвержденный CD4 Т-клеточный эпитоп (PADRE = Ala-Lys-Phe-Val-Ala-Ala-Trp-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-Ala SEQ ID NO: 22), также был включен в анализ в качестве известного универсального CD4 Т-клеточного эпитопа (**Фигура 18**).

Влияние длины и композиции гидрофобной молекулы (Н) на размер частиц

[00600] Принимая во внимание тот факт, что суммарный заряд пептидных антигенных конъюгатов оказался критическим для стимулирования стабильности образованных частиц, мы затем исследовали дополнительные факторы, которые влияют на размер частиц. Предыдущие исследования показали, что длину макромолекул, содержащих мицеллы, липосомы и полимерсомы, можно модулировать для изменения размеров образующихся частиц. Таким образом, применяя модель CD8 Т-клеточного

эпитопа в качестве пептидного антигена (А), доставляемого в виде пептидного антигенного конъюгата Формулы V, мы оценивали, как длина и композиция гидрофобной молекулы (Н) влияет на размер частиц (**Фигура 20**). В соответствии с предыдущими данными, мы установили, что размер и стабильность частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, в большой степени зависели от суммарного заряда пептидного антигенного конъюгата у целого ряда применяемых различных гидрофобных молекул (Н) (**Фигура 20**). При применении суммарного заряда +4 или выше, самая малая гидрофобная молекула (Н), W_5 , состоящая из 5 звеньев триптофана, привела к самым малым частицам со средним диаметром ~ 10 нм, тогда как самая большая гидрофобная молекула (Н), применяемая в этом примере, $2B_2W_8$, привела к частицам с диаметром от 30 до 100 нм (**Фигура 20**). Примечательно, что гидрофобные молекулы промежуточного размера (Н), $2B_5$ и $2BXu_5$ привели к образованию частиц с промежуточным размером, с диаметром частиц $\sim 10-30$ нм, когда суммарный заряд был больше или равен +4.

[00601] В целом, эти результаты привели к неожиданным открытиям, устанавливающим, как можно применять точно определенные химические параметры заряженной молекулы (С) и гидрофобной молекулы (Н) для регулировки размера и стабильности частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами.

Влияние суммарного заряда на размер частиц и стабильность пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих высокогидрофобные пептидные антигены (А)

[00602] Чтобы продемонстрировать переносимость пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, предназначенных для доставки пептидных антигенов (А), которые обладают высокой гидрофобностью, мы выбрали в высшей степени гидрофобный неоантиген LP из библиотеки, включающей 1377 пептидных неоантигенов, из 4 опухолевых линий мыши и синтезировали пептидный антиген в виде либо LP, либо Min, доставляемый в виде пептидного антигенного конъюгата Формулы V, который самоскапливается в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a) (**Фигура 21**). В то время, как для стабилизации гидрофобного Min (GRAVY = 3,96), доставляемого в виде SNP-7/8a, требовался суммарный заряд, который равен или большее 8, для стабилизации гидрофобного LP (GRAVY = 2,0), доставляемого в виде SNP-7/8a, требовался суммарный заряд, который равен или большее 10 (**Фигура 21**). Дополнительным неожиданным открытием явился тот факт, что нативный LP и min не были изготовлены путем твердофазного пептидного синтеза; однако добавление заряженной молекулы (С) и удлинений (B1 и B2) к пептидному антигену (А) на смоле во время твердофазного пептидного синтеза улучшило изготовление, благодаря

предотвращению усечения последовательности и позволению очистки ВЭЖХ в силу улучшенной растворимости в водной и органической растворителях.

Влияние композиции из заряженной молекулы (С) пептидного антигена и гидрофобной молекулы (Н) на иммуногенность

[00603] Наши вышеуказанные результаты показывают, что суммарный заряд является критическим для стабилизации мицелл с наночастицами, образованных пептидными антигенными конъюгатами. Далее мы исследовали влияние композиций из заряженной молекулы (С) и гидрофобной молекулы (Н) на иммуногенность пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих минимальный эпитоп, Adp_{gk} (**Фигуры 22-24**). В то время как пептидный антигенный конъюгат Формулы V без адьюванта не индуцировал CD8 Т-клеточные ответы (**Фигура 22**), все другие композиции пептидных антигенных конъюгатов, сцепленных с TLR-7/8a, индуцировали устойчивые CD8 Т-клеточные ответы (**Фигура 22**). Примечательно, что в то время как пептидный антигенный конъюгат Формулы IV без заряженной молекулы (С) и пептидные антигенные конъюгаты Формулы V, либо с лизином (то есть, с поли(K)), либо с аргинином (то есть, с заряженными молекулами (С) на основе поли(R)), индуцировали устойчивые CD8 Т-клеточные ответы, даже при введении доз вплоть до 0,25 нмоль, тот же неоантиген, вводимый в виде пептидного антигенного конъюгата Формулы V с аспарагиновой кислотой (то есть, с заряженной молекулой (С) на основе поли(D)), не индуцировал CD8 Т-клеточных ответов при введении доз в концентрации 0,25 или 1 нмоль, но индуцировал CD8 Т-клеточные ответы высокой интенсивности при введении доз в концентрации 4 и 16 нмоль. Примечательно, что отрицательно заряженный пептидный антигенный конъюгат (**Фигура 22**) индуцировал CD8 Т-клеточные ответы наивысшей интенсивности после многократных иммунизаций (~ 30% IFN_g⁺ от общего количества CD8 Т-клеток), примерно, в 1,5-2 раза превышающей CD8 Т-клеточные ответы, индуцированные либо пептидным антигенным конъюгатом Формулы IV, либо положительно заряженными пептидными антигенными конъюгатами Формулы V. Эти результаты показывают, что, в то время как пептидные антигенные конъюгаты, которые самоскапливаются в микрочастицы (**Фигура 22**) или положительно заряженные наночастицы (**Фигура 22**), являются более активными для индуцирования CD8 Т-клеточных ответов, в сравнении с отрицательно заряженными пептидными антигенными конъюгатами; отрицательно заряженные пептидные антигенные конъюгаты, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a), могут индуцировать CD8 Т-клеточные ответы, которые в большей степени способны ко вторичному иммунному

ответу, предлагая более высокую интенсивность ответов после многократных иммунизаций.

[00604] Чтобы расширить полученные результаты, мы оценивали, как композиция заряженных молекул (С) пептидных антигенных конъюгатов влияет на CD8 Т-клеточные ответы после подкожного пути введения (**Фигура 23**). Примечательно, что пептидные антигенные конъюгаты Формулы V либо с отрицательно, либо с положительно заряженными молекулами (С) на основе поли(аминокислот), либо поли(К), либо поли(D), соответственно, индуцировали CD8 Т-клеточные ответы более высокой интенсивности, чем пептидные антигенные конъюгаты Формулы V с нейтральным удлинением В1 на основе PEG (**Фигура 23**).

[00605] Важен тот факт, что пептидные антигенные конъюгаты Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a), являются, как было установлено, высокоиммуногенными для выработки CD8 Т-клеточных ответов после применения общих путей вакцинации (внутримышечный (IM), подкожный (SC)), а также внутривенный пути введения (**Фигура 24**).

Влияние размера частиц пептидного антигенного конъюгата и адьювантной активности, и композиции на иммуногенность

[00606] Ранее было неизвестно, как размер частиц, а также количество и активность агонистов TLR влияют на Т-клеточные ответы после однократной или после многократной («вторичной») иммунизации. Существующий уровень техники предполагает, что увеличение количества или активности иммуностимулятора приведет к более высокой интенсивности или, по меньшей мере, не уменьшит интенсивность CD8 Т-клеточных ответов; однако влияние иммуностимулятора, например, агониста TLR, количества и активности на примирование и вторичную иммунизацию CD8 Т-клеточных ответов *in vivo* не были достаточно изучены. Поэтому, в своих следующих исследованиях, мы предприняли попытку оценить, как размер частиц, а также количество и активность агониста, доставляемого на пептидных антигенных конъюгатах Формулы V, влияют на иммуногенность.

[00607] Чтобы определить, как размер частиц и композиция агониста влияли на иммуногенность, мышей вакцинировали иммуногенными композициями, содержащими два пептидных антигенных конъюгата, один из которых доставлял пептидный антиген (А), содержащий минимальный CD8 Т-клеточный эпитоп, а другой доставлял пептидный антиген (А), содержащий минимальный CD4 Т-клеточный эпитоп (**Фигура 25**). Пептидные антигенные конъюгаты Формулы V различали по тому факту, образуют ли они малые частицы (наночастицы (NP) диаметром ~ 20-100 нм) или большие частицы

(микрочастицы (MP) диаметром ~ 1000 нм), доставляющие агонисты TLR-7/8 в различных количествах и с разной активностью. В каждом наборе малых или больших частиц, пептидные антигенные конъюгаты содержали гидрофобную молекулу (Н), которая содержала 1, 2, 3 или 5 молекул **Соединения 1**, 2В или 5 молекул агониста с более высокой активностью, **Соединения 2**, 2ВХу. Мышей дважды вакцинировали данной иммуногенной композицией, и Т-клеточные ответы измеряли в крови через 1 неделю после каждой вакцинации.

[00608] Поразительным и неожиданным открытием было то, что как для малых (20-100 нм), так и для больших частиц (~ 1000 нм), увеличение количества агониста 2В, сцепленного с гидрофобной молекулой (Н), привело к увеличению CD4 и CD8 Т-клеточных ответов, при этом, пептидные антигенные конъюгаты, сцепленные с гидрофобными молекулами (Н), содержали только одну молекулу 2В, что привело к самым низким уровням CD8 и CD4 Т-клеточных ответов. Уровень как CD4, так и CD8 Т-клеточных ответов увеличился после добавления двух молекул 2В, и дополнительно умеренно увеличился после добавления 3 или 5 молекул 2В к гидрофобным молекулам (Н). В соответствии с нашими предыдущими и неожиданными результатами (**Фигуры 6 и 7**), показывающими, что пептидные антигенные конъюгаты, содержащие гидрофобные молекулы (Н), доставляющие, по меньшей мере, 3 молекулы более активного агониста TLR-7/8а, 2ВХу, привели к более низким уровням CD8 Т-клеточных ответов после многократных иммунизаций, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, содержащими гидрофобные молекулы (Н), доставляющие, по меньшей мере, 3 молекулы менее активного агониста 2В, что привело к результатам, отраженным на **Фигуре 25**, показывающим, что 2ВХу₅ приводит к более низким уровням CD8 и CD4 Т-клеточных ответов, по сравнению с применением гидрофобной молекулы (Н), доставляющей агонист с умеренной активностью, 2В₅. Это неожиданное открытие – тот факт, что агонист с более высокой активностью приводит к более низкому уровню иммунных ответов – не был спрогнозирован на основании предыдущих открытий в литературе.

[00609] Таким образом, увеличение количества агониста, **Соединения 1**, 2В, до пептидных антигенных конъюгатов приводило, как правило, к более высоким уровням CD8 Т-клеточных ответов, но эти ответы имели меньшую интенсивность, когда природный стимулятор меняли на агонист с более высокой активностью. Следовательно, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, применяют либо высокие плотности агонистов TLR-7/8а с умеренной активностью, либо низкие плотности агонистов TLR-7/8а с высокой активностью для индуцирования оптимального CD4 и CD8

Т-клеточного ответа с применением иммуногенных композиций, содержащих пептидные антигенные конъюгаты.

Размер частиц

[00610] Другим поразительным и неожиданным открытием явился тот факт, что иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, которые образовывали малые частицы, частицы диаметром $\sim 10-200$ нм, привели к более высокой интенсивности CD4 и CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с пептидными антигенными конъюгатами, которые образовывали более крупные частицы (> 1000 нм в диаметре). Например, в группе, которая получала иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, сцепленные с гидрофобной молекулой (H) 2B₅, и которые образовывали малые частицы, CD8 Т-клеточные ответы составляли, примерно, $\sim 2,5\%$, по сравнению с $\sim 0,5\%$ в группе, которая получала иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, сцепленные с гидрофобной молекулой (H) 2B₅, которые образовывали большие частицы (**Фигура 25**). Аналогичным образом, уровень CD8 Т-клеточных ответов в группе, которая получала иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, сцепленные с гидрофобной молекулой (H) 2B₃W₂ в виде малой частицы, были приблизительно в 10 раз выше, чем в группе, которая получала иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, сцепленные с гидрофобной молекулой (H) 2B₃W₂ в виде большой частицы.

[00611] Таким образом, эти данные показывают, что размер частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, применяемыми в иммуногенных композициях, оказал большое и неожиданное влияние на CD8 Т-клеточный ответ. Следовательно, пептидные антигенные конъюгаты, которые образуют частицы размером 20-100 нм, являются предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения для применения в иммуногенных композициях для выработки оптимального Т-клеточного иммунитета.

[00612] В целом, эти исследования поясняют точные физические и химические параметры, которые являются оптимальными для максимального увеличения уровня CD4 и CD8 Т-клеточных ответов с применением пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению.

[00613] Дополнительным неожиданным открытием явился тот факт, что гидродинамическое поведение и стабильность частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, зависели как от суммарного заряда, так и от общего среднего значения гидропатии (GRAVY), как это было определено с применением способов Кайта

и Дулиттла (см.: Кайт Дж., Дулиттл Р.Ф., Простой способ для отображения гидропатического характера белка, *Biol*, 157: 105–32, 1983), пептидной последовательности, содержащей пептидный антигенный конъюгат. Примечание: определение значения GRAVY и заряда исключают вклады Линкера (L) и гидрофобной молекулы (H) или Частицы (P).

[00614] Соответственно, пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие высокогидрофобные пептидные антигены (A) со значениями GRAVY $> 0,75$, надежно образовывали стабильные частицы в водных буферах при pH, примерно, 7,4, когда суммарный заряд пептидного антигенного конъюгата был \geq (больше или равен) до +6 или \leq (меньше или равен) до -6; умеренно гидрофобные пептидные антигены (A) со значениями GRAVY 0,25-0,75 надежно образовывали стабильные частицы в водных буферах при pH, примерно, 7,4, когда суммарный заряд пептидного антигенного конъюгата был \geq (больше или равен) +5 или \leq (меньше или равен) -5; и пептидные антигены (A) со значениями GRAVY менее 0,25 надежно образовывали стабильные частицы в водных буферах при pH, примерно, 7,4, когда суммарный заряд был \geq (больше или равен) +4 или \leq (меньше или равен) -4. Таким образом, на основании наших неожиданных результатов, можно выбрать соответствующую композицию заряженных молекул (C) и удлинений последовательности (B1 и B2) для модуляции заряда в качестве механизма для стимуляции образования стабильных частиц пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих любую композицию пептидного антигена (A).

Влияние гидродинамического поведения пептидного неоантигена на иммуногенность

[00615] Затем мы оценивали, приведут ли более однородные составы с применением пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a) (**Фигура 26**), к улучшенной иммуногенности CTL-ответов, по сравнению со сцеплением LP-неоантигенов с TLR-7/8 гидрофобного полимера без стабилизации заряда, что приводит к образованию микрочастиц/агрегатов (MP-7/8a), или с более стандартным подходом, заключающимся в смешивании LP-неоантигенов с адьювантом частицы (LP + полиICLC) (**Фигура 27**). Для оценки мы выбрали три неоантигена LP: Adpgk, Cpne1 и Irgq. В то время как Adpgk скапливается в частицы как нативный LP, оба LP – Cpne1 и Irgq LP – являются растворимыми в воде (**Фигура 27 A**).

[00616] В соответствии с нашими более ранними данными, только LP неоантигена, доставляемые в виде частиц, индуцировали CD8 Т-клеточные ответы *in vivo* (**Фигура 27 B** и **C**). Соответственно, растворимые LP – Cpne1 и Irgq, смешанные с pICLC, не вызывали

CD8 Т-клеточных ответов, в то время как те же неоантигены, доставляемый в виде либо MP-7/8a (микрочастица/агрегаты), либо SNP-7/8a (наночастица), приводили к генерации высокой интенсивности CD8 Т-клеточного иммунитета (**Фигура 27 В-Е**). Хотя растворимые LP, смешанные с pICLC, были неактивными, как описано ранее, LP частицы, Adpgk, индуцировал значительное увеличение CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с фоном, что указывало на то, что физическая форма пептидного неоантигена, но не адьюванта, то есть, pICLC, вероятно, учитывалась для слабых Т-клеточных ответов со стороны Cppe1 и Irgq LP, смешанных с pICLC.

[00617] Среди составов, доставляющих неоантигены в формате частиц, мицелла наночастиц (SNP-7/8a) на основе пептидных антигенных конъюгатах Формулы V предлагала ответы с наивысшей интенсивностью, после чего следовали составы с микрочастицей (MP-7/8a) и на последнем месте – только LP, смешанный с адьювантом (**Фигура 27 В-Е**). Примечательно, что уровень ответов со стороны мицелл наночастиц (SNP-7/8a) после однократной иммунизации был значительно (в ~ 5-10 раз) выше, чем уровень ответы со стороны составов с микрочастицами, тогда как ответы после двух или трех иммунизаций были сопоставимы, что указывает на то, что кинетика индукции Т-клеток более малых частиц, мицелл с наночастицами, является более быстрой, по сравнению с кинетикой индукции Т-клеток микрочастиц.

[00618] Механистические исследования для учета наблюдаемых различий в иммуногенности показали, что пептидные антигенные конъюгаты, которые образуют стабильные мицеллы с наночастицами, приводили к поглощению наибольшего количества неоантигенов в дренирующие лимфатические узлы с пиком перед основным компонентом в концентрациях и поглощению в APC лимфатических узлов в день 1, в то время как микрочастица показала более медленное поглощение в лимфатические узлы, причем концентрации достигают пика на день 7, что может свидетельствовать о более медленной кинетики CD8 Т-клеточных ответов, возникающих вследствие микрочастиц (**Фигура 28**). Напротив, растворимый неоантиген, смешанный либо с растворимым адьювантом, либо с адьювантом частицы, показал ограниченное поглощение неоантигена в дренирующие лимфатические узлы. Несмотря на то, что все составы частиц адьюванта индуцируют сопоставимую интенсивность и кинетику природной иммунной активации в лимфатических узлах, только формы частиц антигена приводили к CD8 Т-клеточным ответам. Ограниченная аккумуляция растворимого неоантигена в лимфатических узлах, вероятно, объясняет его неспособность индуцировать CD8 Т-клеточные ответы.

Влияние длины пептида на иммуногенность

[00619] Длина пептида считается основным фактором, который влияет на иммуногенность пептидного антигена (А). Поэтому мы исследовали, как длина пептидных неоантигенов, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a («SNP-7/8a»), влияет на интенсивность CD4 и CD8 Т-клеточных ответов, генерируемых *in vivo* (Фигура 29). Семь пептидных неоантигенов, полученных из линии опухолевых клеток MC38, получали в виде либо минимального эпитопа (min), либо в виде пептидных антигенов (А) на основе LP, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, именуемых в настоящем документе SNP-7/8a, и затем вводили мышам. Наши результаты показывают, что как min, так и LP формы неоантигенов, доставляемых в виде SNP-7/8a, вырабатывают сопоставимую интенсивность CD8 Т-клеточных ответов, которые, примерно, в 10-100 раз выше фона, в том числе против 4 неоантигенов, о которых ранее сообщалось, что они – неиммуногенные. (Фигура 29 А). Однако, как и ожидалось, LP вызывали CD4 Т-клеточные ответы значительно более высокого уровня, по сравнению с min, вероятно, потому что min были слишком короткими, чтобы кодировать эпитоп CD4 (Фигура 29 В). Важно отметить, что эти результаты указывают на то, что длина пептидов оказывает минимальное влияние на CD8 Т-клеточные ответы, и указывают на то, что короткие пептиды (7-14 аминокислот), содержащие минимальные CD4 или CD8 эпитопы, которые являются более эффективными для изготовления при правильном составлении частиц, могут быть предпочтительным для применения в вакцинах, по сравнению с LP (> 20 аминокислот). В этой связи можно заметить, что, усовершенствование алгоритмов прогнозирования МНС-II должно сделать возможным применение минимальных эпитопов для выработки CD4 и CD8 Т-клеточных ответов, что, таким образом, позволит избежать необходимости применения LP.

Сравнительный анализ иммуногенности пептидных неоантигенов, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов, в сравнении со стандартными подходами

Затем мы провели сравнительный анализ активности наших пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a («SNP-7/8a»), с подходом на основе стандартных вакцин на основе пептидов, который заключается в смешивании нативных LP с адьювантом частицы полиICLC (Фигура 30). В соответствии с данными Ядав М., *и др. Nature* 515(7528):572-576 (2014), только 2 из 7 масс-спектрометрически подтвержденных прогнозируемых неоантигенов (Reps1 и Adpgk, оба из которых являются частицами) были иммуногенными при объединении с pICLC, однако все 7 неоантигенов LP вырабатывали CD8 Т-клеточные

ответы с высокой интенсивностью в виде SNP-7/8a, то есть, в виде пептидных антигенов (A), доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V (Фигура 30). Примечательно, что было подтверждено, что все 7 неоантигенов, показанных на **Фигуре 30**, связывают МНС-I опухоли посредством масс-спектрометрии, которая предлагает неожиданное обнаружение того факта, что масс-спектр является надежным фильтром для прогнозирования иммуногенности пептидных антигенов (A), например, неоантигенов.

Взаимосвязь между прогнозируемой аффинностью связывания минимального эпитопа и иммуногенностью

[00620] Наши результаты показывают, что неоантигены на основе пептидов, доставляемых в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a («SNP-7/8a»), являются высокоэффективным подходом для выработки CD4 и CD8 Т-клеточных ответов. Благодаря повышенной эффективности платформы вакцины, можно усовершенствовать алгоритмы прогнозирования иммуногенности. Действительно, мы наблюдали сильную корреляцию между прогнозируемым связыванием МНС-I и иммуногенностью после скрининга 192 уникальных CD8 Т-клеточных эпитопов *in vivo* с SNP-7/8a, причем почти 50% эпитопов с высокой аффинностью (Консенсусная оценка IEDB < 0,5 процентиля) ведут к CD8 Т-клеточным ответам, что почти в 5 раз увеличивает эффективность примирования CD8 Т-клеточных ответов, по сравнению с опубликованными ответами (Фигура 31). Эти результаты показывают, что прогнозируемая *in silico* аффинность связывания, в частности, консенсусная оценка IEDB, в высокой степени прогнозирует иммуногенность пептидного антигена (A).

Пептидные антигенные конъюгаты вызывают устойчивые, опухолеассоциированные (собственный антиген, неоантиген и вирусный антиген)-специфические CD8 и CD4 Т-клеточные ответы, которые опосредуют клиренс опухоли *in vivo*

[00621] Мы исследовали тот факт, могут ли CD8 Т-клеточные ответы неиммуногенных эпитопов, о которых сообщалось ранее, приводить к улучшению клиренса развившихся опухолей (Фигуры 32-33). Наши результаты показывают, что несколько неоантигенов из двух моделей опухолей, MC38 и B16.F10, о которых ранее сообщалось, что они неиммуногенные, приводили к клиренсу развившихся опухолей при доставке в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, которые самоскапливаются в наночастицы, доставляющие TLR-7/8a («SNP-7/8a»). Примечательно, что, хотя Крейтер и др. ранее сообщали о том, что неоантиген-специфические CD4 Т-клеточные ответы преимущественно опосредовали клиренс развившихся опухолей

B16.F10, мы наблюдали, что повышенная эффективность вакцины может мобилизовать как неоантиген-специфические CD4, так и CD8 Т-клеточные ответы для опосредования клиренса B16.F10 (**Фигуры 32 и 34**). Важно отметить, что эти результаты выходят за рамки применения неоантигенов, поскольку как вирусные антигены (ВПЧ Е6 и Е7, **Фигура 35**), так и собственные антигены (Trp1, **Фигура 32**), доставляемые в виде SNP-7/8a, вырабатывали CD8 Т-клеточные ответы с высокой интенсивностью, которые были ассоциированы с улучшением клиренса опухоли.

Частицы, содержащие несколько различных пептидных антигенных конъюгатов, являются стабильными и демонстрируют одинаковый размер частиц

[00622] Подходы к PCV, вероятно, потребуют введения пациенту нескольких различных эпитопов для увеличения широты Т-клеточных ответов. Таким образом, мы оценили толерантность пептидных антигенных конъюгатов **Формулы V**, которые самоскапливаются в наночастицы, совместно доставляющие TLR-7/8a (SNP-7/8a) для применения в мультиантигенных вакцинах на основе частицы, содержащей несколько различных пептидных антигенных конъюгатов (**Фигура 36**). Частица, содержащая несколько различных пептидных антигенных конъюгатов, предлагала постоянный размер частиц 20-40 нм, независимо от композиции LP неоантигена (**Фигура 36**).

Пептидные антигенные конъюгаты Формулы V, доставляющие опухолеассоциированные собственные антигены или антигены инфекционных заболеваний

[00623] Чтобы расширить наши результаты, описанные выше, мы оценивали генерализуемость применения пептидных антигенных конъюгатов в качестве универсальной платформы вакцины для индуцирования Т-клеточного иммунитета. Как показано на **Фигуре 37**, пептидные антигенные конъюгаты **Формулы V**, доставляющие пептидные антигены (А), содержащие онкоген (Kras), пептид, полученный из вируса (ВИЧ), и чужеродный антиген (то есть, овальбумин), все образовывали стабильные наночастицы и индуцировали Т-клеточные ответы с высокой интенсивностью *in vivo*.

Размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных заряженных молекул (С) или различных гидрофобных молекул (Н) на основе поли(аминокислот) Формулы II, сцепленных с адъювантами Формулы III

[00624] Как было продемонстрировано выше, вакцины на основе пептидных антигенных конъюгатов представляют собой модульную платформу, которая может предложить широкий диапазон различных композиций каждого из компонентов, например, заряженных молекул (С), удлинений (В1 и В2), пептидных антигенов (А),

Линкеров (L) и гидрофобных молекул (H). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, возможно потребуются включить заряженную молекулу (C), которая содержит функциональные группы, не зависящие от pH в большинстве физиологически значимых диапазонов pH, например, от pH 4,5 до, примерно, 8,5. Таким образом, мы синтезировали пептидные антигенные конъюгаты либо с суммарным отрицательным, либо с суммарным положительным зарядом, применяя заряженные молекулы (C), которые содержат аминокислоты фосфосерина или триметиллизина (pH-независимый четвертичный аммоний), соответственно (**Фигура 38**). Наши результаты показывают, что пептидные антигенные конъюгаты, включая заряженные молекулы (C) на основе фосфосерина или триметиллизина, образуют стабильные наночастицы и индуцируют Т-клеточные ответы с высокой интенсивностью, тогда как пептидные антигенные конъюгаты без заряженной молекулы (C) образуют агрегаты.

[00625] Чтобы расширить эти результаты, мы продуцировали пептидные антигенные конъюгаты различной длины, 30 аминокислот (**Соединение 20**, именуемое как $2B_5W_{10}G_{10}$) и 15 аминокислот (**Соединение 16**, именуемое как $2B_5G_{10}$) несущих DBCO гидрофобных молекул (H) на основе поли(аминокислот) **Формулы II**, сцепленных с адъювантом **Формулы III**. Неожиданным открытием стало то, что увеличение содержания аминных и ароматических групп в гидрофобных блоках привело к улучшению растворимости в органическом растворителе и, следовательно, к улучшению изготовления, по сравнению с гидрофобными блоками с меньшим количеством ароматических групп или аминов. Соответственно, несмотря на более длительное изменение, $2B_5W_{10}G_{10}$ и его пептидные предшественники были более эффективными в изготовлении, чем $2B_5G_{10}$ и его предшественники.

[00626] Две различные гидрофобные молекулы (H), $2B_5W_{10}G_{10}$ и $2B_5G_{10}$, были сцеплены с фрагментами пептидного антигена, содержащими неоантигены на основе длинных пептидов в качестве пептидного антигена (A), посредством триазольного Линкера (L), с образованием пептидных антигенных конъюгатов **Формулы V**. В соответствии с нашими ранее полученными результатами, образование стабильных наночастиц зависело от суммарного заряда пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные гидрофобные молекулы (H) (**Фигура 38**). Неожиданно обнаружено, что, несмотря на высокую плотность гидрофобных групп на гидрофобных молекулах (H), оба пептидные антигенные конъюгаты образовывали стабильные мицеллы с наночастицами и индуцировали Т-клеточные ответы с высокой интенсивностью *in vivo* (**Фигура 38**). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, более длинная гидрофобная молекула (H) применяется для улучшения кинетической

стабильности пептидных антигенных конъюгатов, что может потребоваться для вакцин, доставляемых внутривенным путем.

Размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных гидрофобных молекул (H) на основе поли(аминокислот) Формулы II, сцепленных с различными агонистами PRR

[00627] Хотя в приведенных выше примерах иммуногенных композиций преимущественно применялись пептидные антигенные конъюгаты, состоящие из гидрофобных молекул (H), сцепленных с TLR-7/8a (например, адъюванты Формулы III) или не сцепленных с Лигандом, гидрофобные молекулы (H) могут быть сцеплены с любым Лигандом. В некоторых

гидрофобную молекулу (H), тогда как в других вариантах осуществления настоящего изобретения, Лиганд, который не обладает адъювантными свойствами, включен в гидрофобную молекулу. Чтобы продемонстрировать генерализуемость пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих различные Лиганды с адъювантными свойствами, мы синтезировали пептидные антигенные конъюгаты Формулы V, состоящие из гидрофобных молекул (H) Формулы II, сцепленных с различными Лигандами, включая агонист TLR-4 (то есть, WW(PI)WW), агонист TLR-2/6 (то есть, WW(PI)WW), агонист TLR-7 (то есть, CL264-W₅), агонист NOD (Мурамил-W₅) и агонист STING (то есть, DMXAA-W₅). В соответствии с нашими ранее полученными результатами, образование стабильных наночастиц зависело от суммарного заряда пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные гидрофобные молекулы (**Фигура 39**), причем все различные иммуногенные композиции на основе гидрофобных молекул (H), содержащих различные Лиганды с адъювантными свойствами, индуцируют измеримый Т-клеточный иммунитет. Примечательно, что агонист TLR-7 индуцировал ответы с наивысшей интенсивностью, и, следовательно, агонисты TLR-7 или TLR-7/8 применяются в предпочтительных вариантах осуществления пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению для индуцирования Т-клеточных ответов либо для профилактики, либо для лечения инфекционных заболеваний или рака.

Присоединение пептидного антигена (A) к гидрофобной молекуле (H) с применением различных линкерных химических соединений (амида и тиоэфира)

[00628] Поскольку в предпочтительных вариантах осуществления пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению применяется клик-химия для образования Линкера (L) из предшественника линкера X1 и предшественника линкера X2, подходят и другие типы линкерных химических соединений. Таким образом, пептидные антигенные конъюгаты Формулы V были сцеплены с гидрофобными молекулами (H) с

применением Линкеров (L) на основе либо амида, либо тиоэфира, при этом, Линкер (L) был сцеплен либо посредством N-, либо C-конца пептидного антигена. (A). Наши результаты показывают, что пептидные антигены (A), сцепленные посредством либо N-, либо C-конца удлинения пептидного антигена (посредством либо B1, либо B2) с Линкером (L), содержащим либо амид, либо тиоэфир, привели к пептидным антигенным конъюгатам, которые образовывали стабильные наночастицы и индуцировали Т-клеточные ответы с высокой интенсивностью *in vivo* (**Фигура 40**), хотя пептидные антигены (A), сцепленные посредством амидного Линкера (L) с гидрофобной молекулой (B), индуцировали ответы с более высокой интенсивностью, по сравнению с пептидными антигенами, сцепленными с применением тиоэфирного Линкера (L). Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, стабильные амидные или триазольные Линкеры (L) применяются для сцепления пептидных антигенов (A) с гидрофобными молекулами (H) либо непосредственно, либо посредством удлинений (B1 или B2).

Размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных гидрофобных молекул (H) на основе жирных кислот, липидов и холестерина

[00629] Поскольку в предпочтительных вариантах осуществления пептидных антигенных конъюгатов по настоящему изобретению применяются гидрофобные молекулы (H),

состоящие из полимеров, например, поли(аминокислот) или диблок-сополимеров типа А-В, гидрофобные молекулы (H) могут быть на основе множества других гидрофобных молекул, таких как, жирные кислоты, липиды и холестерин. Таким образом, пептидные антигенные конъюгаты Формулы V были сцеплены с гидрофобными молекулами (H) на основе миристиновой кислоты (Mug или C14, **Соединения 49 и 52**), пальмитиновой кислоты (Palm или C16, **Соединения 51 и 53**), холестерина (Chol, **Соединения 57 и 58**) и диациллипида (Pam2Cys, **Соединения 54 и 55**). В соответствии с нашими ранее полученными результатами, стабильное образование наночастиц зависело от суммарного заряда пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные гидрофобные молекулы (**Фигура 41**), с суммарным зарядом, который больше или равен +6, что приводило к образованию стабильных наночастиц. Важно отметить, что иммуногенные композиции пептидных антигенных конъюгатов на основе жирных кислот, холестерина и гидрофобных молекул (H) на основе липидов индуцировали Т-клеточные ответы с высокой интенсивностью *in vivo* (**Фигура 41**). Хотя частицы на основе жирных кислот, холестерина и липидов демонстрировали подходящие характеристики с точки

зрения образования частиц и биологической активности в качестве пептидных антигенных конъюгатов, одним из ограничений является то, что гидрофобные молекулы (Н) на основе жирных кислот, холестерина и липидов труднее изготавливать из-за ограниченной растворимости этих материалов во многих растворителях (например, плохая растворимость в DMSO, DMF и во многих спиртах), что требует биологически более жестких хлорированных растворителей (например, дихлорметан и хлороформ), что затрудняет определение характеристик и очистку, особенно в отношении стратегий индивидуализированных вакцин, и увеличивает риски для безопасности, по сравнению, например, с гидрофобными молекулами (Н), состоящими из полимеров, содержащих ароматические группы, которые растворимы в большинстве органических растворителей (например, DMSO, метанол, этанол, ацетонитрил и прочее).

Размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, состоящих из различных гидрофобных молекул (Н) на основе диблок-сополимеров типа А-В

[00630] Пептидные антигенные конъюгаты Формулы IV и Формулы V получали присоединением пептидных антигенов (А) к диблок-сополимерам на основе НРМА (см. **Соединения 68-72**). Неожиданно, мицеллообразующие диблок-сополимеры образовали высокостабильные мицеллы с наночастицами независимо от суммарного заряда фрагмента пептидного антигена (**Фигура 42**). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, при этом, гидрофобная молекула (Н) представляет собой диблок-сополимер, состоящий из мономеров НРМА, пептидные антигенные конъюгаты Формулы IV могут быть предпочтительными. Диблок может образовывать частицы в водных условиях независимо от температуры, или образование частиц может зависеть от температуры. Кроме того, Лиганд может быть включен в любой из двух блоков, либо на концах, либо в боковые группы диблок-сополимера. Наши результаты показывают, что диблок-полимер типа А-В, состоящий из мономеров НРМА, обеспечивает стабильное образование наночастиц и приводит к Т-клеточным ответам с высокой интенсивностью при включении в качестве гидрофобной молекулы (Н) иммуногенных композиций, содержащих пептидные антигенные конъюгаты (**Фигура 42**).

Размер частиц и стабильность пептидных антигенных конъюгатов Формулы V на основе пептидных антигенов (А), сцепленных с частицами

[00631] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат содержит гидрофобную молекулу (Н); однако, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат содержит предварительно образованную Частицу (Р). Зависимость заряда

фрагмента пептидного антигена от стабильности частиц на основе пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, содержащих Частицу (P), оценивали путем присоединения фрагментов пептидного антигена (C-B1-A-B2-) с различным суммарным зарядом к предварительно образованным Частицам (P) на основе липосом, полистирола, частиц кремния и оксида железа. В соответствии с нашими ранее полученными результатами, образование стабильных наночастиц зависело от суммарного заряда пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные гидрофобные молекулы (**Фигура 43**).

Размер частиц и биологическая активность пептидных антигенных конъюгатов, доставляющих аутоантигены, применяемые для индуцирования толерантности

[00632] Пептидные антигенные конъюгаты также можно применять для индуцирования толерантности или супрессивных регуляторных Т-клеток. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, для индуцирования толерантности или иммуносупрессии, Лиганд с адъювантными свойствами обычно не включен. Вместо этого, пептидный антигенный конъюгат должен содержать частицу, содержащую пептидный антиген (A), гидрофобную молекулу (H) или Частицу (P) и необязательный Линкер (L), заряженную молекулу (C) и удлинения (B1 и/или B2), при этом, Лиганд с адъювантными свойствами не включен. Чтобы оценить генерализуемость пептидных антигенных конъюгатов, описанных в настоящем документе, для применения с целью индукции толерантности или супрессии, продуцировали модели аутоантигенов для индуцирования артрита (то есть, Коллаген II) и синдрома ЦНС, который напоминает MS (то есть, миелин-олигодендроцитарный гликопротеин, «MOG»), в качестве пептидных антигенов (A) на пептидных антигенных конъюгатах Формулы V. В соответствии с нашими более ранними результатами, аутоантигены, доставленные на пептидных антигенных конъюгатах Формулы V, скапливались в стабильные наночастицы и индуцировали низкий уровень ответов регуляторных Т-клеток (**Фигура 44**).

Размер частиц и биологическая активность частиц, состоящих из A-H + C-H или A-H(C) (Формула VI).

[00633] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, иммуногенная композиция содержит частицу, состоящую из пептидных антигенных конъюгатов без заряженных молекул (например, A-[B2]-[L]-H), смешанных с пептидными антигенными конъюгатами (например, C-[A']-[L]-H). Например, пептидный антигенный конъюгат, состоящий из неоантигена LP (Adp_{gk}), был сцеплен посредством триазольного Линкера (L) с гидрофобной молекулой 2B₃W₂ с образованием пептидного антигенного конъюгата (A-L-H), который был смешан с конъюгатом заряженной молекулы (C-H),

Соединением 42 ($K_{10}-2B_3W_2$) с образованием стабильных наночастиц, которые индуцировали Т-клеточный иммунитет с высокой интенсивностью (**Фигура 45**). В другом варианте осуществления настоящего изобретения, пептидный антигенный конъюгат, состоящий из неоантигена LP (Adpgk,) был сцеплен посредством триазольного Линкера (L) с гидрофобной молекулой $2B_3W_2$ с образованием пептидного антигенного конъюгата (A-L-H), который был смешан с конъюгатом заряженной молекулы, дополнительно содержащим консервативный антиген A' (то есть, C-A'-H), с образованием стабильных наночастиц, которые индуцировали Т-клеточный иммунитет с высокой интенсивностью (**Фигура 45**).

[00634] В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, заряженная молекула (C) может быть сцеплена с гидрофобной молекулой (H), которая сцеплена с пептидным антигеном (A) с образованием пептидного антигенного конъюгата Формулы VI. В неограничивающем примере, пептидный неоантиген (Adpgk) доставляется в виде пептидного антигена (A) на пептидном антигенном конъюгате формулы A-[L]-H(C), и было установлено, что полученный конъюгат образует стабильные наночастицы и Т-клеточный иммунитет с высокой интенсивностью. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления иммуногенных композиций, содержащих частицы, может быть предложено, что заряженная молекула (C) сцеплена, либо непосредственно, либо опосредованно, с пептидным антигеном (A), или она может быть предложена на отдельной молекуле, которая ассоциируется с частицами, образованными пептидными антигенными конъюгатами.

[00635] Важным является тот факт, что настоящее изобретение описывает новые подходы к вакцинам на основе пептидов, именуемых пептидными антигенными конъюгатами, которые приводят к неожиданным улучшениям интенсивности и широты Т-клеток, генерируемых в ответ на пептидные антигены (A), включая опухлеассоциированные антигены (собственные антигены, неоантигены и вирусные антигены), антигены инфекционных заболеваний и чужеродные антигены. Также было установлено, что иммуногенные композиции, содержащие пептидные антигенные конъюгаты, которые исключают адъюванты, индуцируют низкий уровень толерогенных/супрессивных ответов на аутоантигены, что может быть полезно для лечения аутоиммунных заболеваний и/или аллергических реакций.

[00636] В настоящем изобретении, мы демонстрируем неожиданный результат, заключающийся в том, что пептидные антигены (A), содержащие минимальный эпитоп (ME), могут приводить к CD8 Т-клеточным ответам с более высокой интенсивностью, чем тот же самый ME, доставленный в виде синтетического длинного пептида (SLP), когда их

оба нормализуют по фармакокинетике путем доставки их обоих в виде наночастиц, состоящих из пептидных антигенных конъюгатов. Кроме того, мы приводим примеры, когда ME, доставляемый в SLP в виде пептидного антигенного конъюгата, не приводит к CD8 T-клеточным ответам после однократной иммунизации, но ME, доставляемый в виде пептидного антигенного конъюгата, приводит, предположительно, за счет более эффективного процессинга, который приводит к увеличенной презентации клеточных поверхностей ME в контексте молекул MHC I посредством APC. Было установлено, что такие вакцины на основе ME расширяют широту T-клеточных ответов, которые, как было дополнительно показано, являются функциональными в контексте уменьшения роста развившихся опухолей. Поэтому, основываясь на наших неожиданных результатах, в предпочтительных вариантах осуществления иммуногенных композиций по настоящему изобретению применяются пептидные антигенные конъюгаты, доставляющие пептидные антигены (A) на основе минимальных эпитопов, или комбинация ME с SLP. Хотя в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, пептидный антиген (A) представляет собой SLP (или «LP»).

[00637] Кроме того, чтобы обеспечить улучшенный контроль над загрузкой материалов и размером, и стабильностью частиц, доставляющих пептидные антигены (A) с рядом свойств, мы раскрываем в настоящем документе новый подход к доставке пептидных антигенов (A) в виде пептидных антигенных конъюгатов, которые скапливаются в мицеллярные и наноразмерные надмолекулярные ассоциаты в водных буферах. Важно отметить тот факт, что мы показываем, как можно оптимизировать композицию пептидных антигенных конъюгатов, включая необязательную стабилизирующую частицы заряженную молекулу (C), гидрофобную молекулу (H), необязательный Линкер и необязательные удлинения последовательности (B1 и B2), чтобы обеспечить достижение стабильных частиц определенных размеров для любого возможного пептидного антигена (A). Мы показываем, что надежное образование частиц и улучшенная стабильность могут быть достигнуты путем регулировки длины и гидрофобных характеристик гидрофобной молекулы (H), а также путем модуляции заряда частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами.

[00638] В качестве механизма для улучшения процессинга T-клеточных эпитопов, содержащих пептидный антигенный конъюгат, мы демонстрируем полезность применения N- и C-концевых удлинений (B1 и B2 или «удлинения»), которые стабильны в водных условиях, но, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, гидролизуются ферментами в эндосомах антигенпрезентирующих клеток,

тем самым ограничивая таким клеткам процессинг и презентацию антигена и стимулируя эффективное высвобождение минимального CD8 и/или CD4 Т-клеточного эпитопа в APC.

[00639] В заключение необходимо отметить, что в настоящем открытии, мы систематически оценивали оптимальную композицию, количество и активность иммуностимуляторов на основе агониста PRR, требуемых для стимуляции Т-клеточного иммунитета. Мы предлагаем на обозрение данные, свидетельствующие о том, что прогрессивное увеличение количества и активности агонистов TLR, которые индуцируют продуцирование IL-12 и IFN типа I, первоначально приводит к увеличенной интенсивности Т-клеточных ответов, но в контексте нового и неожиданного результата, заключающегося в том, что это приводит к дополнительному увеличению более узкой широты антигенного спектра и более низкой интенсивности Т-клеточных ответов. Поэтому мы сообщаем о композиции, количестве и активности иммуностимуляторов (то есть, агонистов PRR), прикрепленных к гидрофобной молекуле (H), которые являются предпочтительными для предложения оптимальной интенсивности, качества и широты Т-клеточного иммунитета.

[00640] Подводя итог вышесказанному, следует отметить, что неожиданные результаты, раскрытые в настоящем документе, относятся к:

i. Оптимальной длине пептидных антигенов (A), применяемых в противораковых вакцинах для обеспечения надежного примирования Т-клеточного иммунитета.

ii. Применению удлинений последовательности пептидного антигена, то есть, N- и/или C-концевых удлинений (B1 и/или B2), которые облегчают изготовление вакцин на основе пептидов, стимулируют стабильность частиц и облегчают процессинг с тем, чтобы допустить эффективную презентацию посредством APC.

iii. Композиции заряженных молекул (C) и суммарному заряду пептидных антигенных конъюгатов, необходимых для индукции и стабилизации частиц оптимального размера для стимулирования Т-клеточного иммунитета.

iv. К тому, как длина гидрофобной молекулы (H) и композиция влияют на размер и стабильность частиц, образованных пептидными антигенными конъюгатами, а также на их иммуногенность *in vivo*.

v. К тому, как активность и качественные характеристики Лиганда (например, агониста PRR), включенного в гидрофобные молекулы (H), влияют на широту, интенсивность и качество Т-клеточных ответов.

[00641] Во всем описании настоящего изобретения и в формуле изобретения, указанной ниже, если иное не предусмотрено контекстом, слова «содержит» и «включает» и такие варианты, как «содержащий» и «включающий», следует понимать как

подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел; или включение указанной композиции или композиций, но не исключение какой-либо другой композиции или композиций.

[00642] Ссылка на любой существующий уровень техники в настоящем описании не является и не должна рассматриваться как подтверждение какой-либо формы предположения того обстоятельства, что такой уровень техники является частью общеизвестного уровня техники.

[00643] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что применение настоящего изобретения не ограничивается описанным конкретным применением. Настоящее изобретение также не ограничивается своим предпочтительным вариантом осуществления в контексте конкретных элементов и/или признаков, описанных или изображенных в настоящем документе. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается раскрытым вариантом осуществления или вариантами осуществления, но допускает многочисленные реконфигурации, модификации и замещения, не отклоняясь от объема настоящего изобретения, который изложен и определен в нижеуказанной формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный антигенный конъюгат, содержащий:
 - a. пептидный антиген (А);
 - и
 - b. либо гидрофобную молекулу (Н), либо Частицу (Р),
отличающийся тем, что пептидный антиген (А) сцеплен либо с гидрофобной молекулой (Н), либо с Частицей (Р), непосредственно или опосредованно, посредством необязательного N-концевого удлинения (В1), которое сцеплено с N-концом пептидного антигена (А) или с необязательным С-концевым удлинением (В2), которое сцеплено с С-концом пептидного антигена (А), необязательно, при этом, гидрофобная молекула (Н) или Частица (Р) сцеплена с удлинением (В1 или В2) опосредованно, посредством Линкера (L).
2. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 1, дополнительно содержащий заряженную молекулу (С).
3. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 2, отличающийся тем, что пептидный антигенный конъюгат имеет суммарный электростатический заряд, который больше или равен, примерно, +3 или меньше или равен, примерно -3, в водном буферном растворе при рН, примерно, 7,4.
4. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-3, отличающийся тем, что заряженная молекула (С) и либо гидрофобная молекула (Н), либо Частица (Р), обе присоединены либо к N-концу, либо к С-концу пептидного антигена (А) непосредственно или посредством необязательного N-концевого удлинения (В1), или необязательного С-концевого удлинения (В2), соответственно.
5. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 2 и 3, отличающийся тем, что заряженная молекула (С) и либо гидрофобная молекула (Н), либо Частица (Р) присоединены к противоположным концам пептидного антигена (А).
6. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 5, отличающийся тем, что (i) заряженная молекула (С) присоединена к N-концу пептидного антигена (А) посредством N-концевого удлинения (В1), и (ii) либо гидрофобная молекула (Н), либо Частица (Р) присоединена посредством С-концевого удлинения (В2) к С-концу пептидного антигена (А).
7. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-6, отличающийся тем, что N-концевое удлинение (В1) содержит разлагаемую ферментами пептидную последовательность, содержащую аминокислоту РN1, отличающийся тем, что РN1 выбрана из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина.

8. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 7, отличающийся тем, что разлагаемая ферментами пептидная последовательность, содержащая аминокислоту PN1, дополнительно содержит, по меньшей мере, одно из следующего:

- a. аминокислоту PN2, которая выбрана из глицина, валина, лейцина или изолейцина;
- b. аминокислоту PN3, которая выбрана из глицина, серина, пролина или лейцина;
- c. аминокислоту PN4, которая выбрана из аргинина, лизина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, глицина или серина; или
- d. любую из комбинаций a-c.

9. Пептидный антигенный конъюгат либо по пункту 7, либо по пункту 8, отличающийся тем, что разлагаемая ферментами пептидная последовательность содержит тетрапептид, выбранный из:

- a. Ser-Leu-Val-Cit;
- b. Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 4);
- c. Ser-Pro-Val-Cit;
- d. Gly-Pro-Val-Cit;
- e. Gly-Pro-Leu-Cit;
- f. Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 5);
- g. Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 6);
- h. Ser-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 21);
- i. Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7);
- j. Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 8);
- k. Glu-Leu-Val-Cit;
- l. Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 10);
- m. Glu-Pro-Val-Cit; или
- n. Glu-Gly-Val-Cit,

при этом, Glu может быть заменен на Asp; и/или, при этом, Arg может быть заменен на Lys.

10. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-9, отличающийся тем, что С-концевое удлинение (B2) содержит разлагаемую ферментами пептидную последовательность, содержащую:

- i. Одиночную аминокислоту PC1', выбранную из глицина, серина, аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина;

ii. Дипептид, при этом, PC1' выбрана из глицина или серина; а PC2' выбрана из глицина, серина, пролина, аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина;

iii. Трипептид, при этом, PC1' выбрана из глицина или серина; а PC2' выбрана из глицина, серина или пролина, а PC3' выбрана из глицина, серина, аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина;

iv. Тетрапептид, при этом, PC1' выбрана из глицина или серина; PC2' выбрана из глицина, серина, пролина или лейцина; PC3' выбрана из глицина, валина, лейцина или изолейцина; а PC4' выбрана из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина.

v. Пентапептид, при этом, PC1' выбрана из глицина или серина; PC2' выбрана из глицина, серина, пролина, аргинина, лизина, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты; PC3' выбрана из глицина, серина, пролина или лейцина; PC4' выбрана из глицина, валина, лейцина или изолейцина; а PC5' выбрана из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина; или

vi. Гексапептид, при этом, PC1' выбрана из глицина или серина; PC2' выбрана из глицина, серина или пролина; PC3' выбрана из глицина, серина, пролина, аргинина, лизина, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты; PC4' выбрана из пролина или лейцина; PC5' выбрана из глицина, валина, лейцина или изолейцина; и PC6' выбрана из аргинина, лизина, цитруллина, глутамина, треонина, лейцина, норлейцина или метионина.

11. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 10, отличающийся тем, что С-концевое удлинение (B2) содержит разлагаемую ферментами пептидную последовательность, содержащую:

a. гексапептид, выбранный из:

i. Gly-Gly-Lys-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 11);

ii. Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 13);

iii. Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 61);

iv. Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Cit;

v. Gly-Gly-Ser-Pro-Val-Cit;

vi. Gly-Gly-Ser-Pro-Leu-Cit;

vii. Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 14);

viii. Gly-Gly-Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 15);

ix. Gly-Gly-Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 16);

x. Gly-Gly-Glu-Leu-Val-Cit; и

при этом, Glu может быть заменен на Asp; и/или, при этом, Arg может быть заменен на Lys; или

- b. пентапептид, выбранный из:
 - i. Gly-Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 17);
 - ii. Gly-Ser-Pro-Val-Cit;
 - iii. Gly-Ser-Pro-Leu-Cit;
 - iv. Gly-Ser-Leu-Val-Cit;
 - v. Gly-Lys-Pro-Val-Cit;
 - vi. Gly-Lys-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 18);
 - vii. Gly-Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 19);
 - viii. Gly-Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 20); и

при этом, Glu может быть заменен на Asp; и/или, при этом, Arg может быть заменен на Lys; или

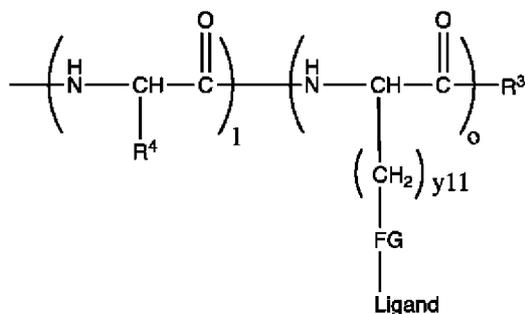
- c. тетрапептид, выбранный из:
 - i. Ser-Leu-Val-Cit;
 - ii. Ser-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 4);
 - iii. Ser-Pro-Val-Cit;
 - iv. Ser-Pro-Leu-Cit;
 - v. Glu-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 5);
 - vi. Ser-Pro-Val-Arg (SEQ ID NO: 6);
 - vii. Ser-Leu-Val-Arg (SEQ ID NO: 7);
 - viii. Lys-Pro-Leu-Arg (SEQ ID NO: 8);
 - ix. Glu-Leu-Val-Cit;
 - x. Glu-Leu-Val-Leu (SEQ ID NO: 10);
 - xi. Glu-Pro-Val-Cit; или
 - xii. Glu-Gly-Val-Cit, и

при этом, Glu может быть заменен на Asp; и/или, при этом, Arg может быть заменен на Lys; или

- d. трипептид, выбранный из:
 - i. Gly-Ser-Gly;
 - ii. Gly-Ser-Arg;
 - iii. Gly-Ser-Leu;
 - iv. Gly-Ser-Cit;
 - v. Gly-Pro-Gly;
 - vi. Gly-Pro-Arg;

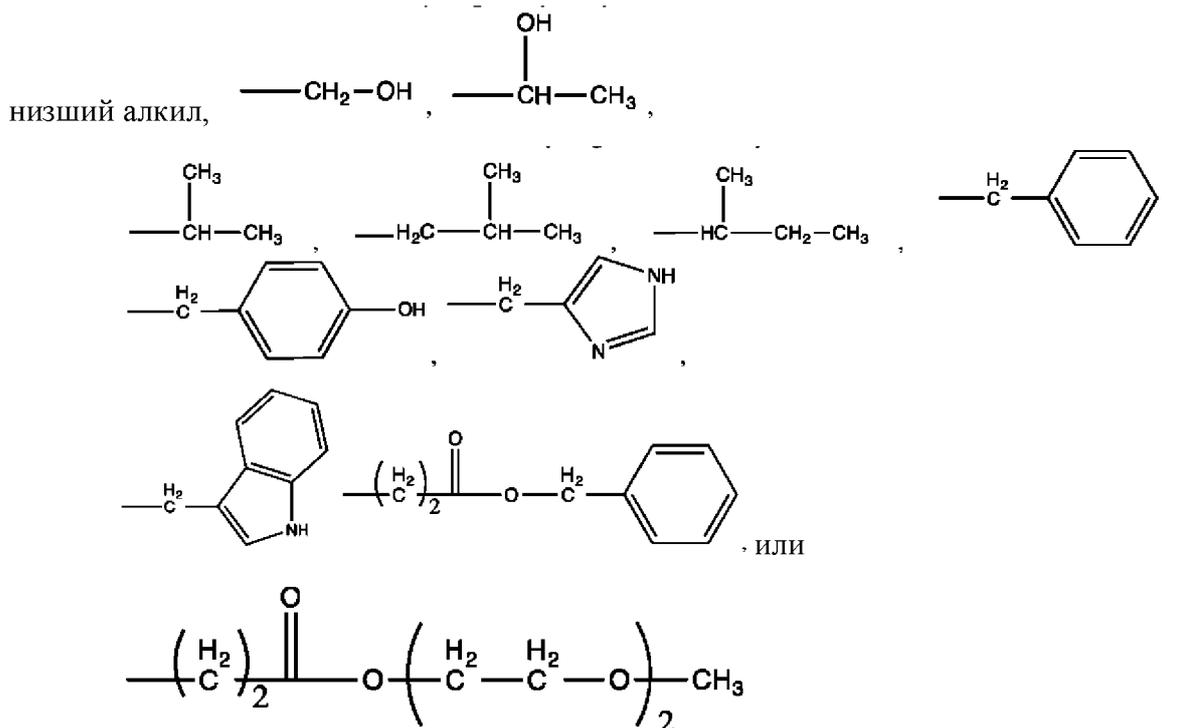
при этом, R^2 выбран из одного из следующих: водород, гидроксил или амин, x составляет от 3 до 300; $y3$ составляет от 1 до 8, и Лиганд присоединен посредством линкера X, посредством любых подходящих механизмов.

16. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 14, отличающийся тем, что гидрофобная молекула (H) представляет собой поли(аминокислоту) Формулы II:



Формула II

при этом, 1 составляет 3-300, а o составляет 0-300; R^3 выбран из одного из следующих: водород, гидроксил или амин; R^4 выбран из одного из следующих: водород,



$y11$ обычно выбирают из 1-8, и FG представляет собой функциональную группу, выбранную из карбоновой кислоты, альдегида, кетона, амина, тиола, азиды или алкина, которая сцеплена с Лигандом с адъювантными свойствами; и N-конец сцеплен либо непосредственно, посредством амидной связи, либо опосредованно, посредством линкера, либо непосредственно с пептидным антигеном, либо посредством удлинения (B1 или B2) и/или Линкера (L), или заряженной молекулы (C).

17. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 14, отличающийся тем, что гидрофобная молекула (Н) содержит гомополимер или сополимер, состоящий из поли(лейцина), поли(триптофана), поли(γ -глутамилдиэтиленгликоля монометилового эфира), поли(γ -бензилглутамата), поли(N-изопропилакриламида) (NIPAM), поли[2(2-метоксиэтокси)этилметакрилата] (DEGMA) или поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламида] (HPMA).

18. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 15, отличающийся тем, что гидрофобная молекула (Н), содержащая поли(аминокислоты) Формулы I, привита или сцеплена на конце со вторым полимером на основе поли(лейцина), поли(триптофана), поли(γ -глутамилдиэтиленгликоля монометилового эфира), поли(γ -бензилглутамата), поли(N-изопропилакриламида) (NIPAM), поли[2(2-метоксиэтокси)этилметакрилата] (DEGMA) или поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламида] (HPMA).

19. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 16, отличающийся тем, что гидрофобная молекула (Н), содержащая поли(аминокислоты) Формулы II, привита или сцеплена на конце со вторым полимером на основе поли(лейцина), поли(триптофана), поли(γ -глутамилдиэтиленгликоля монометилового эфира), поли(γ -бензилглутамата), поли(N-изопропилакриламида) (NIPAM), поли[2(2-метоксиэтокси)этилметакрилата] (DEGMA) или поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламида] (HPMA).

20. Пептидные антигенные конъюгаты либо по пункту 18, либо по пункту 19, отличающиеся тем, что второй полимер содержит множество мономерных звеньев от, примерно, 30 до 500 мономерных звеньев.

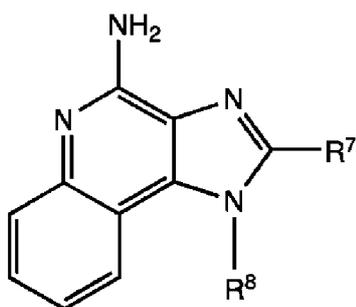
21. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 14-20, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один адъювант сцеплен в виде подвешенной боковой группы с полимером, содержащим гидрофобную молекулу (Н).

22. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 14-20, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один адъювант сцеплен с одним концом полимера (полутелехелатным).

23. Пептидный антигенный конъюгат либо по пункту 21, либо по пункту 22, отличающийся тем, что адъювант представляет собой либо агонист Толл-подобного рецептора, либо агонист STING.

24. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 23, отличающийся тем, что агонист Толл-подобного рецептора представляет собой либо агонист Толл-подобного рецептора-7, и/либо -8.

25. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 24, отличающийся тем, что адъювант представляет собой имидазохинолин Формулы III:



Формула III

при этом, R^7 выбран из одного из следующих: водород, необязательно замещенный низший алкил или необязательно замещенный низший эфир; а R^8 выбран из одного из следующих: необязательно замещенный ариламин или необязательно замещенный низший алкиламин.

26. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 25, отличающийся тем, что, по меньшей мере, три молекулы имидазохинолина Формулы III сцеплены с полимером, содержащим гидрофобную молекулу (H), и R^8 выбран из одного необязательно замещенного низшего алкиламина.

27. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 26, отличающийся тем, что, по меньшей мере, три молекулы имидазохинолина Формулы III сцеплены с полимером, содержащим гидрофобную молекулу (H), и R^8 выбран из одного необязательно замещенного низшего ариламина.

28. Пептидный антигенный конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что Частица (P) или гидрофобная молекула (H) нерастворимы вплоть до концентрации 0,1 мг/мл в водном буферном растворе при pH, примерно, 7,4 и при температуре от, примерно, 20° C до 40° C.

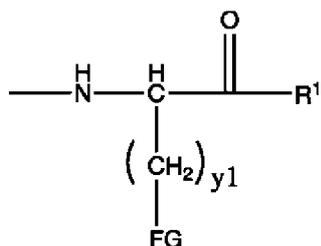
29. Пептидный антигенный конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что пептидный антигенный конъюгат скапливается в частицы, состоящие из мицелл или других типов надмолекулярных ассоциатов нано- или микро-размера, содержащих, по меньшей мере, 2 пептидных антигенных конъюгата, и их размер больше 5 нм в водном буферном растворе при pH, примерно, 7,4.

30. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 29, отличающийся тем, что пептидный антигенный конъюгат скапливается в мицеллы диаметром от, примерно, 5 до 200 нм в водном буферном растворе при pH, примерно, 7,4.

31. Пептидные антигенные конъюгаты по пункту 29, отличающиеся тем, что пептидный антигенный конъюгат представляет собой агрегат в водном буферном растворе при pH, примерно, 7,4.

32. Пептидный антигенный конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что предшественник линкера X1 сцеплен либо непосредственно, либо посредством С-концевого удлинения (B2) с пептидным антигеном (A) и образует сцепление с предшественником линкера X2 либо на гидрофобной молекуле (H), либо на Частице (P).

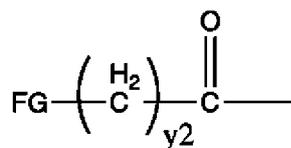
33. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 32, отличающийся тем, что предшественник линкера X1 имеет формулу:



при этом, N-концевой амин метки сцеплен либо непосредственно, либо посредством С-концевого удлинения B2 с пептидным антигеном (A); R¹ выбран из одного из следующих: водород, гидроксил или амин; y1 представляет собой целое число от 1 до 8; и FG выбран из одного из следующих: тиол, амин, азид или алкин (или DBCO).

34. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 33, отличающийся тем, что FG представляет собой азид, а y1 равен 4, дополнительно, при этом, азид сцеплен с молекулой DBCO, которая сцеплена с Частицей (P) или гидрофобной молекулой (H).

35. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-32, отличающийся тем, что предшественник линкера X1 сцеплен с N-концевым удлинением (B1) и имеет формулу:



при этом, карбонил метки сцеплен либо непосредственно, либо посредством удлинения B1 с N-концом пептидного антигена (A); y2 представляет собой целое число от 1 до 8; и FG выбран из одного из следующих: тиол, амин, азид или алкин (или DBCO).

36. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-35, отличающийся тем, что пептидный антиген (P), необязательное N-концевое удлинение (B1), необязательное С-концевое удлинение (B2) и необязательная заряженная молекула (C), и необязательный предшественник линкера X1 синтезированы в виде одиночного пептида посредством твердофазного пептидного синтеза, и, при этом, С-концевое удлинение (B2)

содержит пролин (или псевдопролин во время твердофазного пептидного синтеза, в то время как последовательность присоединена к смоле, применяемой для синтеза пептида).

37. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 2-36, отличающийся тем, что заряженная молекула (С) содержит, по меньшей мере, одну функциональную группу, выбранную из первичного амина, вторичного амина, третичного амина, четвертичного амина, гуанидиния, имидазолия, аммония, сульфония, фосфония, карбоксилата, сульфата, фосфата, фосфорамидата или фосфоната.

38. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 37, отличающийся тем, что заряженная молекула (С) содержит как отрицательно, так и положительно заряженные функциональные группы.

39. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 2-38, отличающийся тем, что ряд заряженных функциональных групп, содержащих заряженную молекулу (С), имеет некоторые характеристики, отрегулированные следующим образом:

a. суммарный электростатический заряд пептидного антигенного конъюгата содержит положительное значение, которое больше или равно, примерно, +6, когда пептидный антиген (А) имеет общее среднее значение гидропатии, которое больше или равно, примерно, 0,75;

b. суммарный электростатический заряд пептидного антигенного конъюгата содержит положительное значение, которое больше или равно, примерно, +5, когда пептидный антиген (А) имеет общее среднее значение гидропатии, которое больше или равно, примерно, 0,25 и меньше, примерно, 0,75;

c. суммарный электростатический заряд пептидного антигенного конъюгата содержит положительное значение, которое больше или равно, примерно, +4, когда пептидный антиген (А) имеет общее среднее значение гидропатии, которое меньше, примерно, 0,25;

d. суммарный электростатический заряд пептидного антигенного конъюгата содержит отрицательное значение, которое меньше или равно, примерно, -6, когда пептидный антиген (А) имеет общее среднее значение гидропатии, которое больше или равно, примерно, 0,75;

e. суммарный электростатический заряд пептидного антигенного конъюгата содержит отрицательное значение, которое меньше или равно, примерно, -5, когда пептидный антиген (А) имеет общее среднее значение гидропатии, которое больше или равно, примерно, 0,25 и меньше, примерно, 0,75; или

f. суммарный электростатический заряд пептидного антигенного конъюгата содержит положительное значение, которое большее или равное, примерно, -4, когда

пептидный антиген (А) имеет общее среднее значение гидропатии, которое меньше, примерно, 0,25;

40. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 39, отличающийся тем, что пептидный антиген (А), N-концевое удлинение (В1), С-концевое удлинение (В2), заряженная молекула (С) и предшественник линкера Х1 продуцированы в виде одиночного пептида, который растворим в водном буферном растворе до концентрации, примерно, 1,0 мг/мл при рН, примерно, 7,4.

41. Частица, содержащая пептидные антигенные конъюгаты по любому из пунктов 1-40.

42. Частица по пункту 41, отличающаяся тем, что частица содержит множество различных пептидных антигенных конъюгатов.

43. Иммуногенная композиция, содержащая пептидные антигенные конъюгаты по любому из пунктов 1-40 или частицы по пунктам 41-42.

44. Иммуногенная композиция по пункту 43, дополнительно содержащая адъювант вакцины.

45. Иммуногенная композиция либо по пункту 43, либо по пункту 44, отличающаяся тем, что композиция содержит множество различных пептидных антигенных конъюгатов.

46. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-40, частица по любому из пунктов 41 и 42 или иммуногенная композиция по любому из пунктов 43-45, отличающаяся тем, что пептидный антиген (А) содержит опухолеассоциированные антигены.

47. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 46, частица по пункту 46 или иммуногенная композиция по пункту 46, отличающаяся тем, что опухолеассоциированный антиген представляет собой неоантиген.

48. Пептидный антигенный конъюгат по любому из пунктов 1-40 и 46-47, частица по любому из пунктов 41-42 и 46-47 или иммуногенная композиция по любому из пунктов 43-47, отличающаяся тем, что пептидный антиген (А) представляет собой минимальный CD4 или CD8 Т-клеточный эпитоп.

49. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 43-47, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция содержит от 10 до 50 различных пептидных антигенных конъюгатов, состоящих из пептидных антигенов (А), выбранных из минимальных CD4 Т-клеточных эпитопов, CD8 Т-клеточных эпитопов или как из минимальных CD4, так и CD8 Т-клеточных эпитопов.

50. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 43-47, отличающаяся тем, что иммуногенная композиция содержит 10-50 различных пептидных антигенных конъюгатов, состоящих из пептидных антигенов (А), выбранных как из минимальных CD4 Т-клеточных эпитопов, так и из минимальных CD8 Т-клеточных эпитопов или как из минимальных CD4, так и CD8 Т-клеточных эпитопов, а также из синтетических длинных пептидов из 15-35 аминокислот, содержащих CD8 Т-клеточный эпитоп и/или CD4 Т-клеточный эпитоп.

51. Пептидный антигенный конъюгат по пункту 48, частица по пункту 48 или иммуногенная композиция по любому из пунктов 48-50, отличающаяся тем, что минимальные CD8 Т-клеточный или CD4 Т-клеточный эпитопы имеют прогнозируемую аффинность связывания, которая меньше или равна 0,5 процентиля по алгоритму Консенсуса IEDB для молекул МНС, соответствующих субъекту.

52. Иммуногенная композиция по любому из пунктов 43-51, дополнительно содержащая пептидный антигенный конъюгат, отличающийся тем, что пептидный антиген (А) представляет собой универсальный CD4 Т-клеточный эпитоп.

53. Способ лечения пациента, страдающего заболеванием, содержащий введение пациенту, страдающему этим заболеванием, пептидного антигенного конъюгата по этому способу или иммуногенной композиции по любому из предыдущих пунктов.

54. Способ по пункту 53, отличающийся тем, что настоящий способ дополнительно содержит введение дополнительной иммунотерапевтической модальности, включая ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, такие как, антитела анти-PD1, анти-PD-L1 или анти-CTLA-4; методы терапии на основе инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и Т-клеток с химерными антигенными рецепторами; биспецифические антитела; противоопухолевые антитела; или лекарственные препараты, предназначенные для преодоления иммунной супрессии.

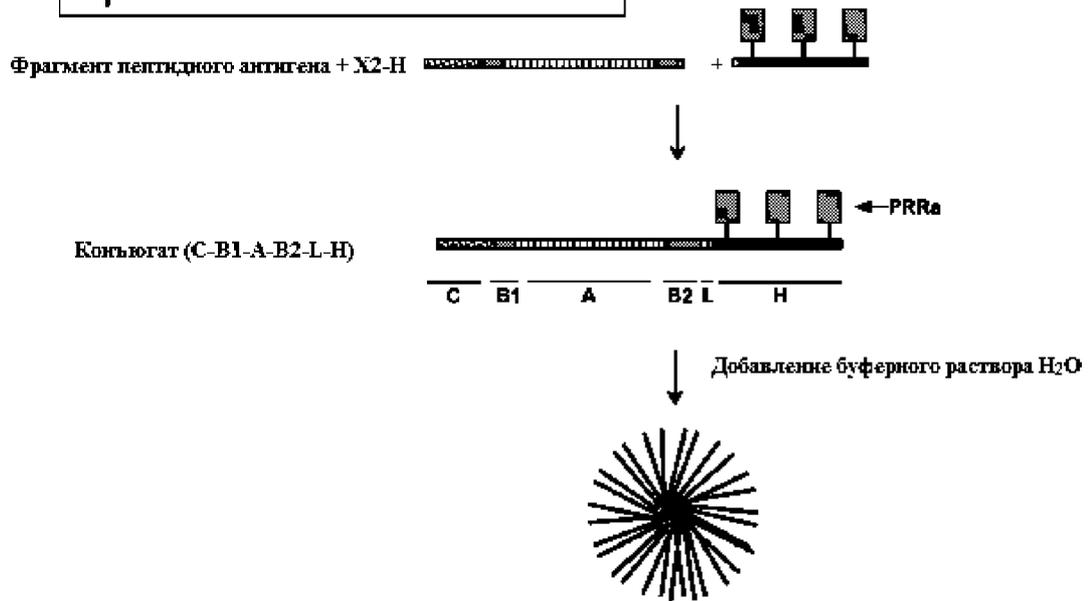
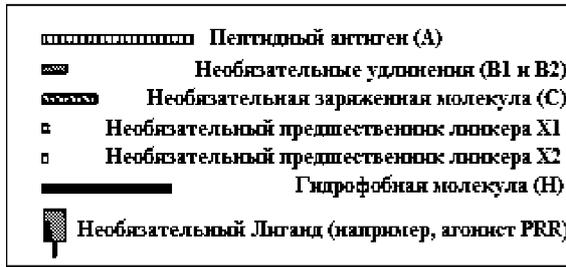
55. Способ либо по пункту 53, либо по пункту 54, отличающийся тем, что настоящий способ содержит гетерологичную схему иммунизации, при этом, иммуногенные композиции или пептидный антигенный конъюгат по любому из предыдущих пунктов применяют либо в режиме примирования, либо в режиме вторичной иммунизации с гетерологичной вакциной.

56. Способ по любому из пунктов 53-55, отличающийся тем, что лечение применяют в комбинации с лучевой терапией, химиотерапией или хирургией.

57. Применение пептидного антигенного конъюгата, частицы или иммуногенной композиции по любому из пунктов 1-52 в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания.

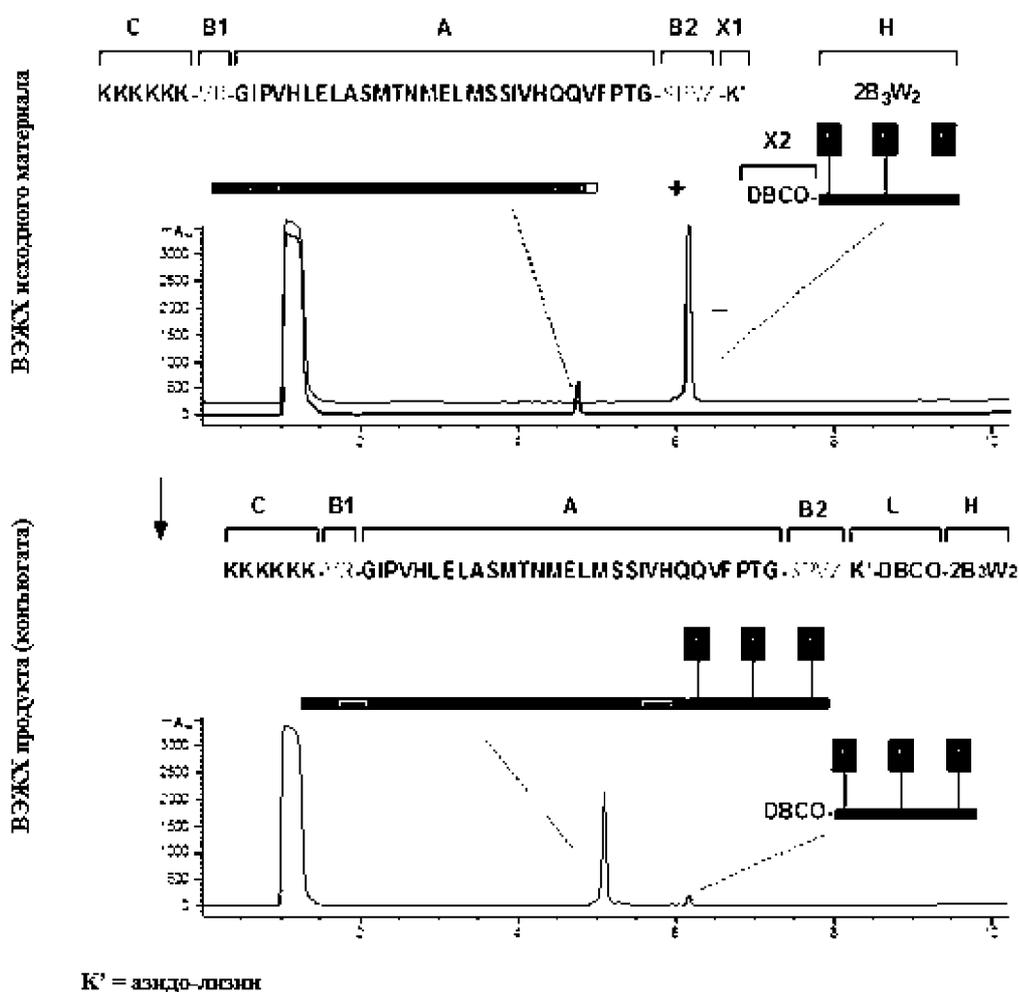
Неограничивающий пример пептидного
антигенного конъюгата Формулы V

Условные обозначения,
применяемые в Фигуре



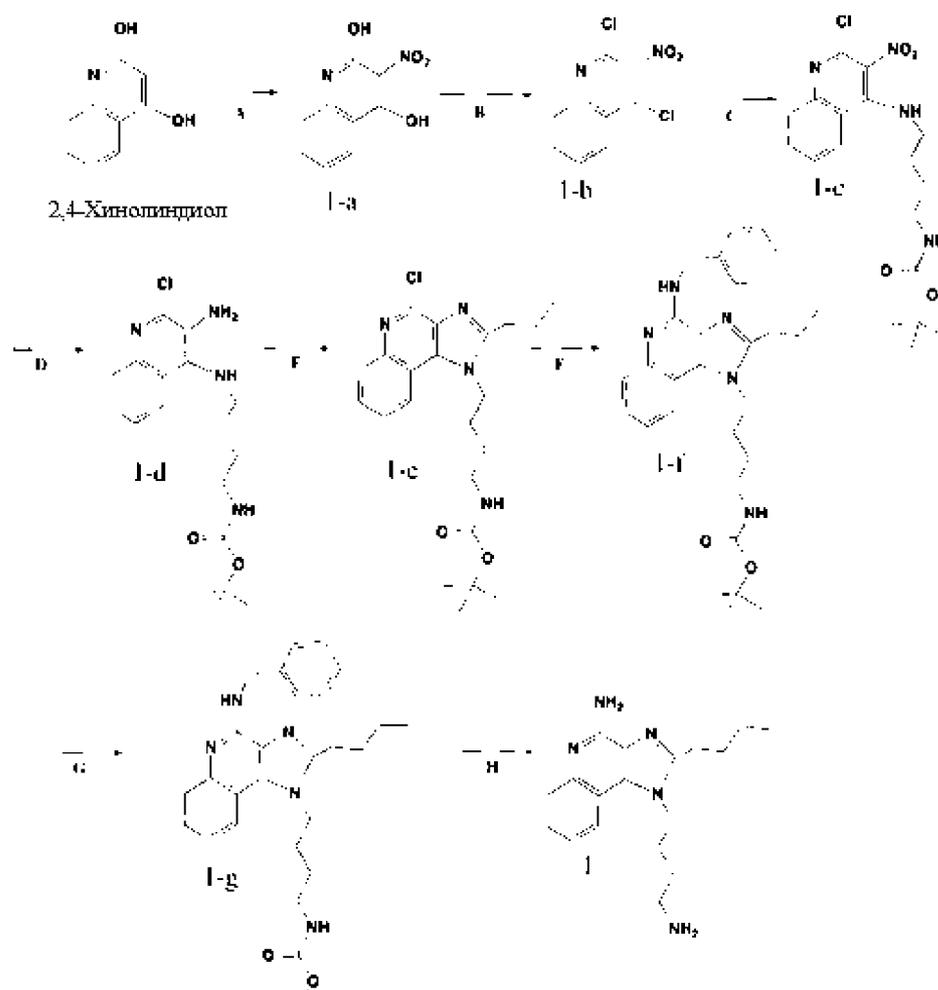
ФИГ. 1

Пример реакции между предшественником линкера X1 (K¹), содержащим азид, и предшественником линкера X2, содержащим DBCO, в результате которой образуется триазольный Линкер (L), который соединяет пептидный антиген (A) с Гидрофобной молекулой (H).



Фиг. 2

Синтез Соединения 1



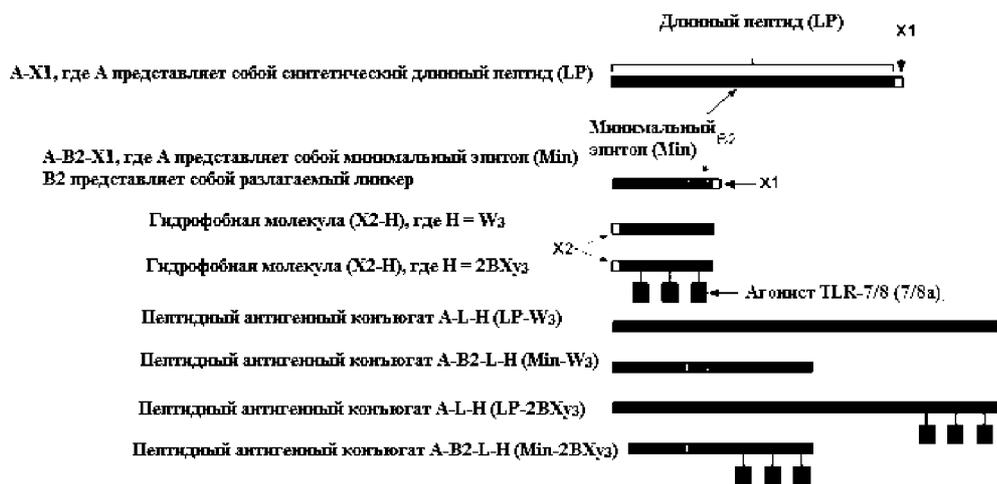
(A) HNO_3 , 75°C , 1ч; (B) PhPOCl_2 , 130°C , 3ч; (C) R-NH_2 , DCM, 70°C , 2ч (D) 10% рт/с (платина на углеродных носителях), EtOAc (Этилацетат), 55 psi (фунт/кв.дюйм) H_2 , 2ч (E) (i) Валеронилхлорид, THF, RT, 2ч (ii) CaO(s) , метанол, 100°C ; 5ч (F) Бензилламин, 110°C , 8ч (G) 98% H_2SO_4 , 2ч

ФИГ. 3

Вакцина	Последовательность A-B2-X1 или A-B2-(L)-H, или A-X1, или A-(L)-H	Молекулярная масса	Образов ание частицы
Irgq LP	<u>KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-K'</u>	2761,2	Нет
Irgq Min	<u>AALLNSAVLG-SLVR-K'</u>	1536,7	Нет
Irgq LP-W ₃	<u>KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-(K'-DBCO)-W₃</u>	3623,5	Да
Irgq Min-W ₃	<u>AALLNSAVLG-SLVR-(K'-DBCO)-W₃</u>	2399,0	Да
Irgq LP-2BXy ₃	<u>KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD(K'-DBCO)-2BXy₃</u>	4476,0	Да
Irgq Min-2BXy ₃	<u>AALLNSAVLG-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy₃</u>	3251,5	Да
Cpne1 LP	<u>DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-K'</u>	2957,3	Нет
Cpne1 Min	<u>SSPYSLHYLS-SLVR-K'</u>	1763,1	Нет
Cpne1 LP-W ₃	<u>DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-(K'-DBCO)-W₃</u>	3819,7	Нет
Cpne1 Min-W ₃	<u>SSPYSLHYLS-SLVR-(K'-DBCO)-W₃</u>	2625,4	Да
Cpne1 LP-2BXy ₃	<u>DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-(K'-DBCO)-2BXy₃</u>	4672,2	Да
Cpne1 Min-2BXy ₃	<u>SSPYSLHYLS-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy₃</u>	3477,9	Да

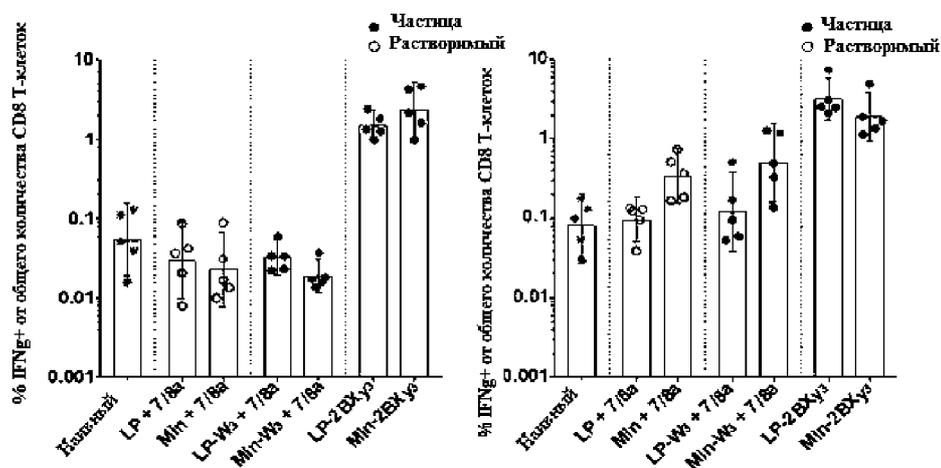
K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклоктин

Фиг. 4

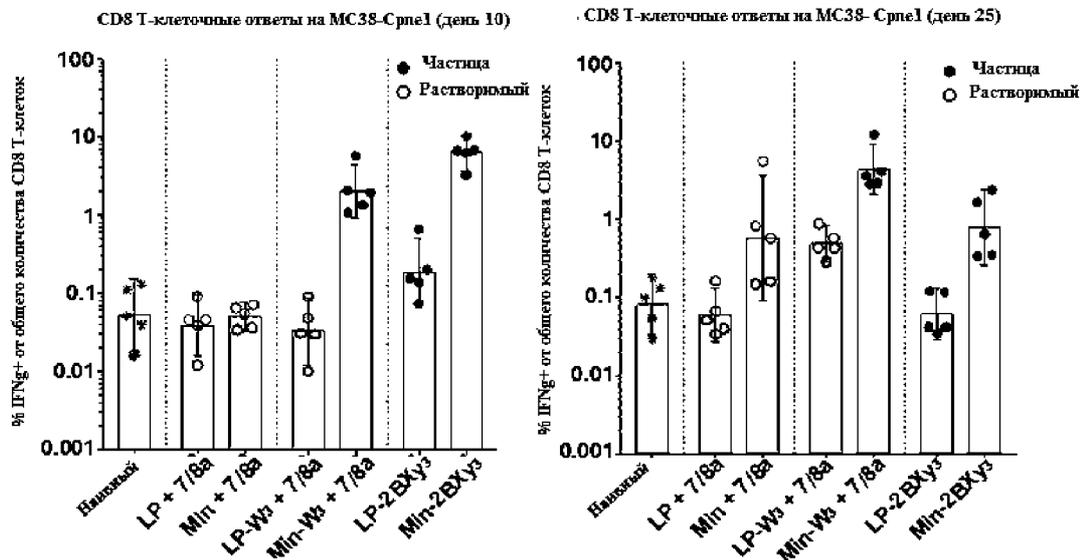
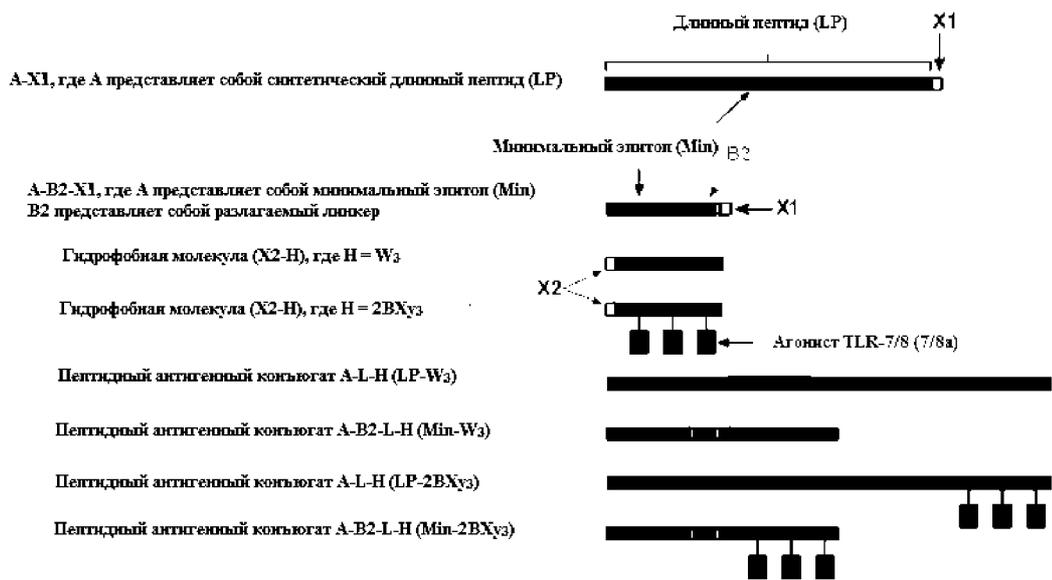


CDS T-клеточные ответы на MC38-Igq (день 10)

CDS T-клеточные ответы на MC38-Igq (день 25)



Фиг. 5

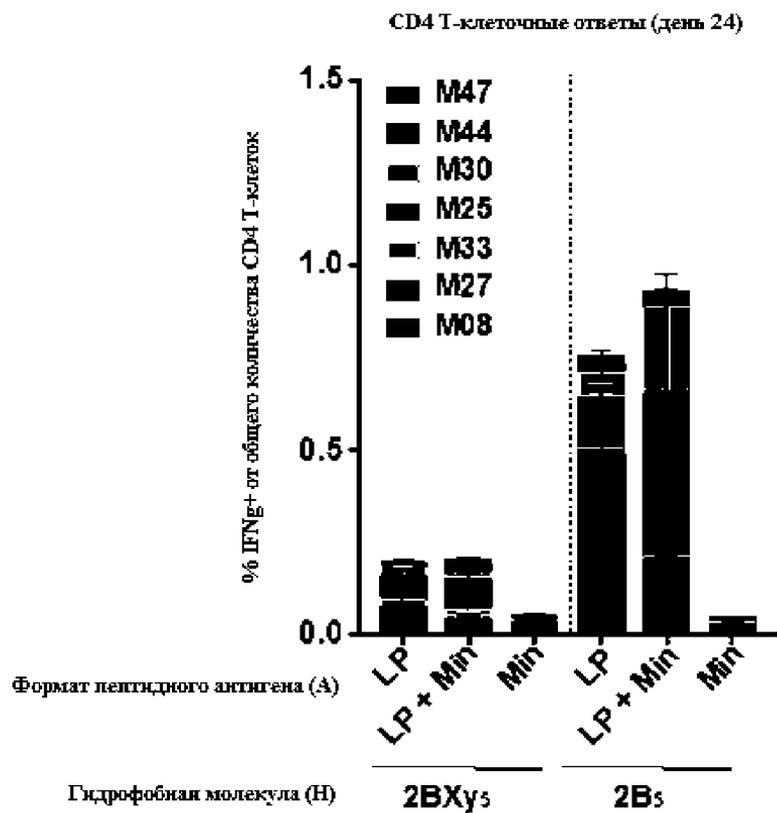
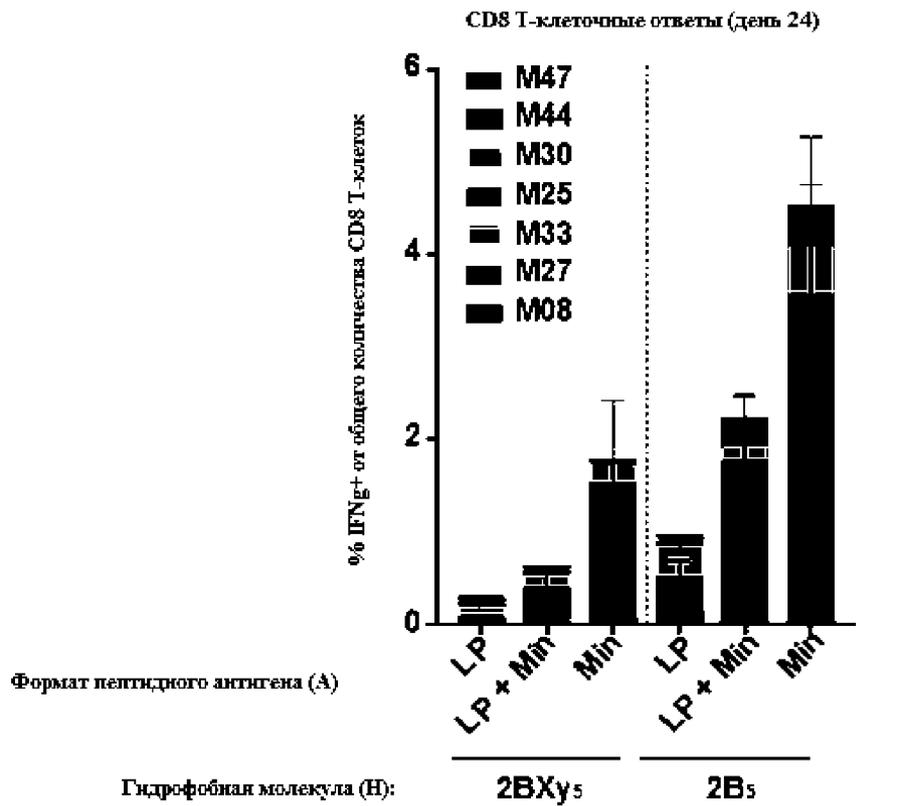


Фиг. 6

Вакцина	Последовательность <u>A-B2-(L)-H</u> или <u>A-(L)-H</u>	Молекулярная масса	Образование частицы
M33 LP-2BX ₅	<u>DSGSPFPAAVILRDALHMARGLKYLHQ</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	5772,97	Да
M08 LP-2BX ₅	<u>ANFESGKHKYRQTAMFTATMPPAVERL</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	5890,76	Да
M27 LP-2BX ₅	<u>REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	5944,04	Да
M47 LP-2BX ₅	<u>GRGHLLGRLAAIVGKQVLLGRKVVVVVR</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	5673,96	Да
M30 LP-2BX ₅	<u>PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	5947,17	Да
M44 LP-2BX ₅	<u>EFKHIKAFDRTFANNPGPMVVFATPGM</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	5831,74	Да
M25 LP-2BX ₅	<u>STANYNTSHLNNDVWQIFENPVDWKEK</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	6058,97	Да
M33 Min-2BX ₅	<u>AAVILRDALH-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	4342,18	Да
M08 Min-2BX ₅	<u>QTAMFTATMP-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	4362,21	Да
M27 Min-2BX ₅	<u>LCPGNKYEMR-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	4474,34	Да
M47 Min-2BX ₅	<u>AAIVGKQVLL-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	4275,17	Да
M30 Min-2BX ₅	<u>FQEFVDWENV-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2BX ₅	4663,38	Да
M33 LP-2B ₅	<u>DSGSPFPAAVILRDALHMARGLKYLHQ</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5532,97	Да
M08 LP-2B ₅	<u>ANFESGKHKYRQTAMFTATMPPAVERL</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5650,76	Да
M27 LP-2B ₅	<u>REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5704,04	Да
M47 LP-2B ₅	<u>GRGHLLGRLAAIVGKQVLLGRKVVVVVR</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5433,96	Да
M30 LP-2B ₅	<u>PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5707,17	Да
M44 LP-2B ₅	<u>EFKHIKAFDRTFANNPGPMVVFATPGM</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5591,74	Да
M25 LP-2B ₅	<u>STANYNTSHLNNDVWQIFENPVDWKEK</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	5818,97	Да
M33 Min-2B ₅	<u>AAVILRDALH-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	4102,18	Да
M08 Min-2B ₅	<u>QTAMFTATMP-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	4122,21	Да
M27 Min-2B ₅	<u>LCPGNKYEMR-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	4234,34	Да
M47 Min-2B ₅	<u>AAIVGKQVLL-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	4035,17	Да
M30 Min-2B ₅	<u>FQEFVDWENV-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B ₅	4423,38	Да

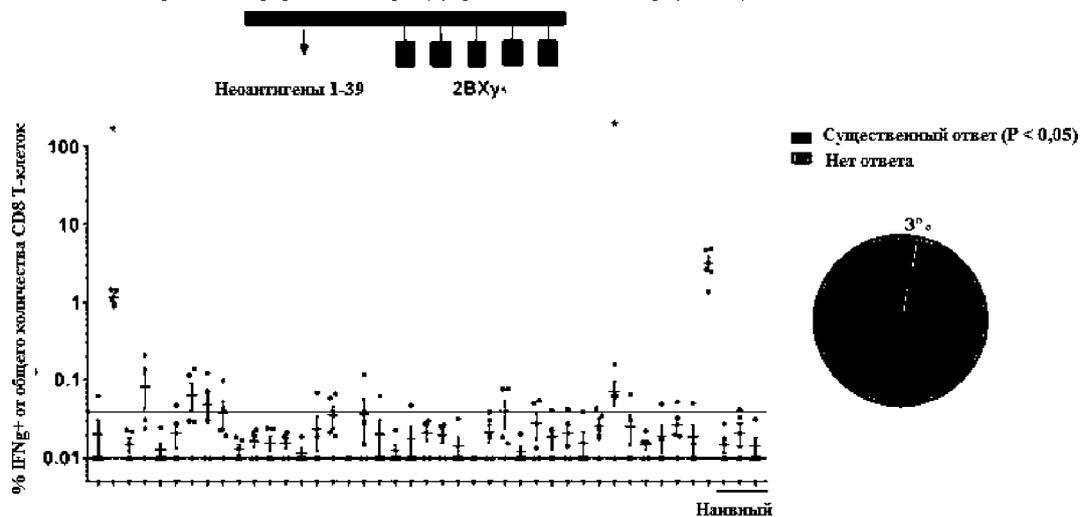
K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктенин

Фиг. 7

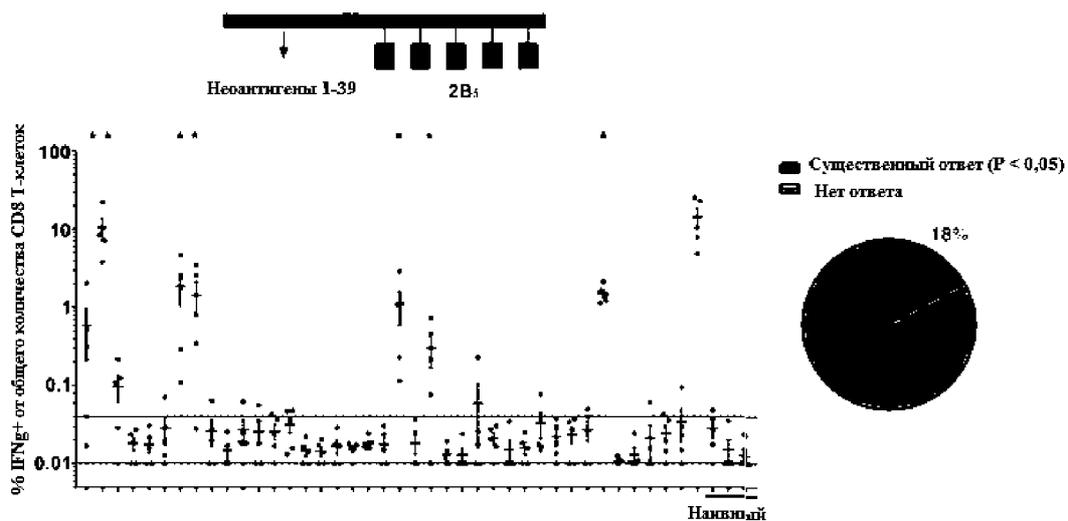


Фиг. 8

CD8 T-клеточные ответы на неоантигены MC38, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов, при этом, гидрофобная молекула (H) представляет собой 2ВХ_{ys} (день 24)

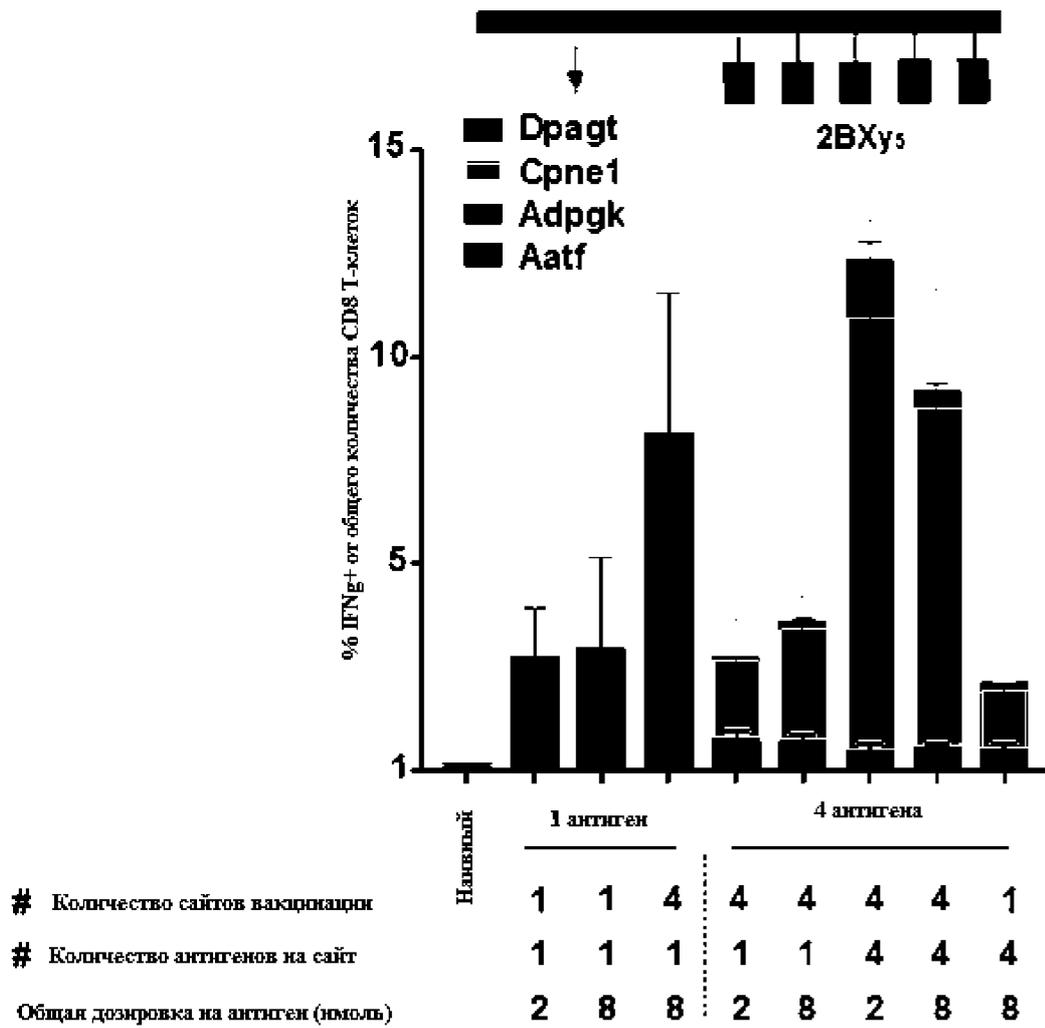


CD8 T-клеточные ответы на неоантигены MC38, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов, при этом, гидрофобная молекула (H) представляет собой 2Вz (день 24)

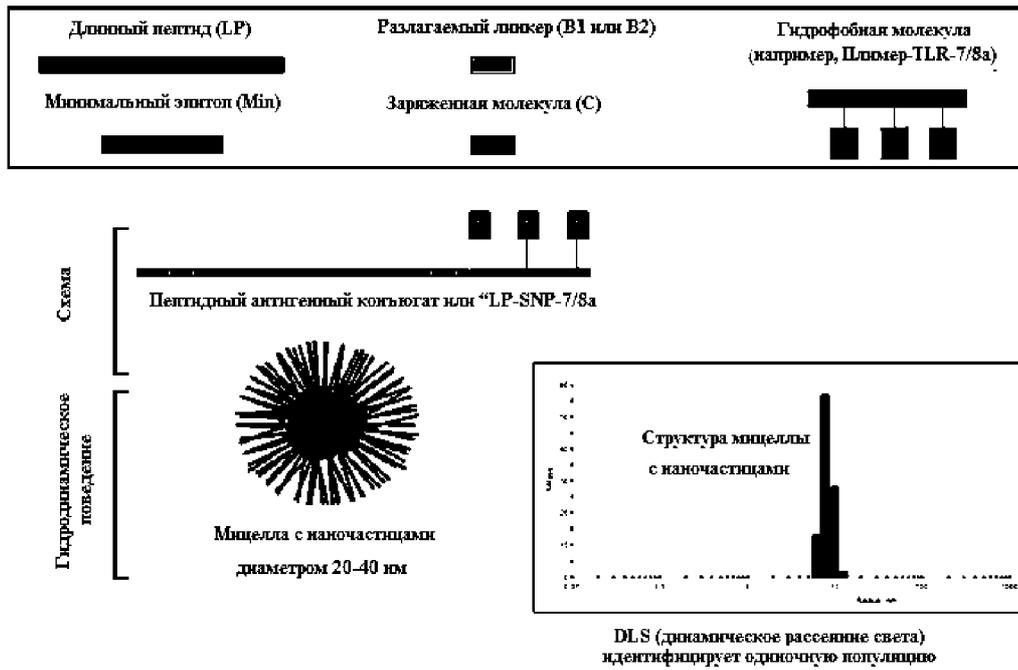


ФИГ. 9

CD8 T-клеточные ответы (день 24)

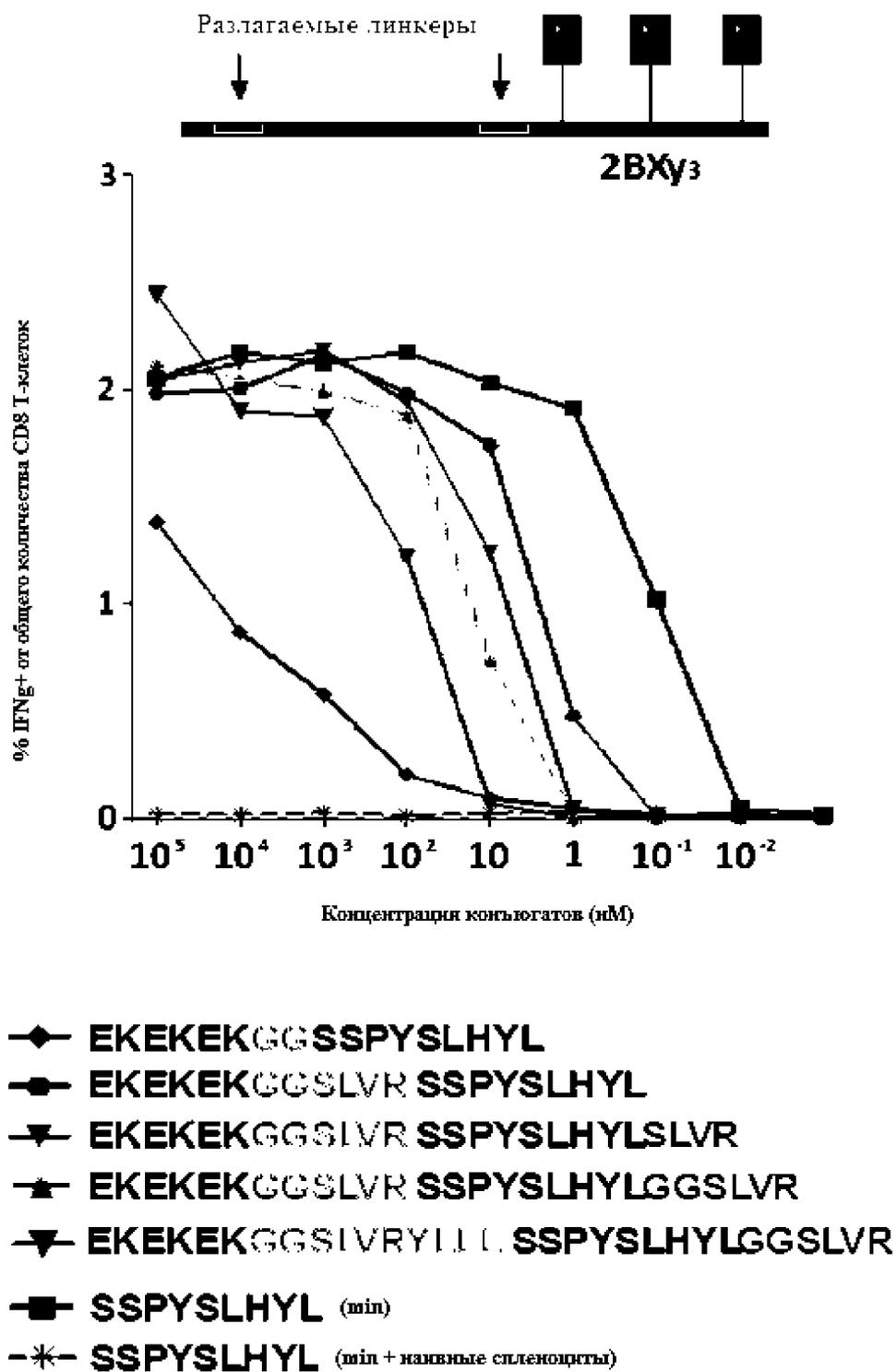


Фиг. 10



Схематическое представление пептидных антигенных конъюгатов Формулы V (именуемых как LP-SNP-7/8a или Min-SNP-7/8a), при этом, гидрофобная молекула представляет собой поли(лактоид), сцепленную с агонистами TLR-7/8.

Фиг. 11

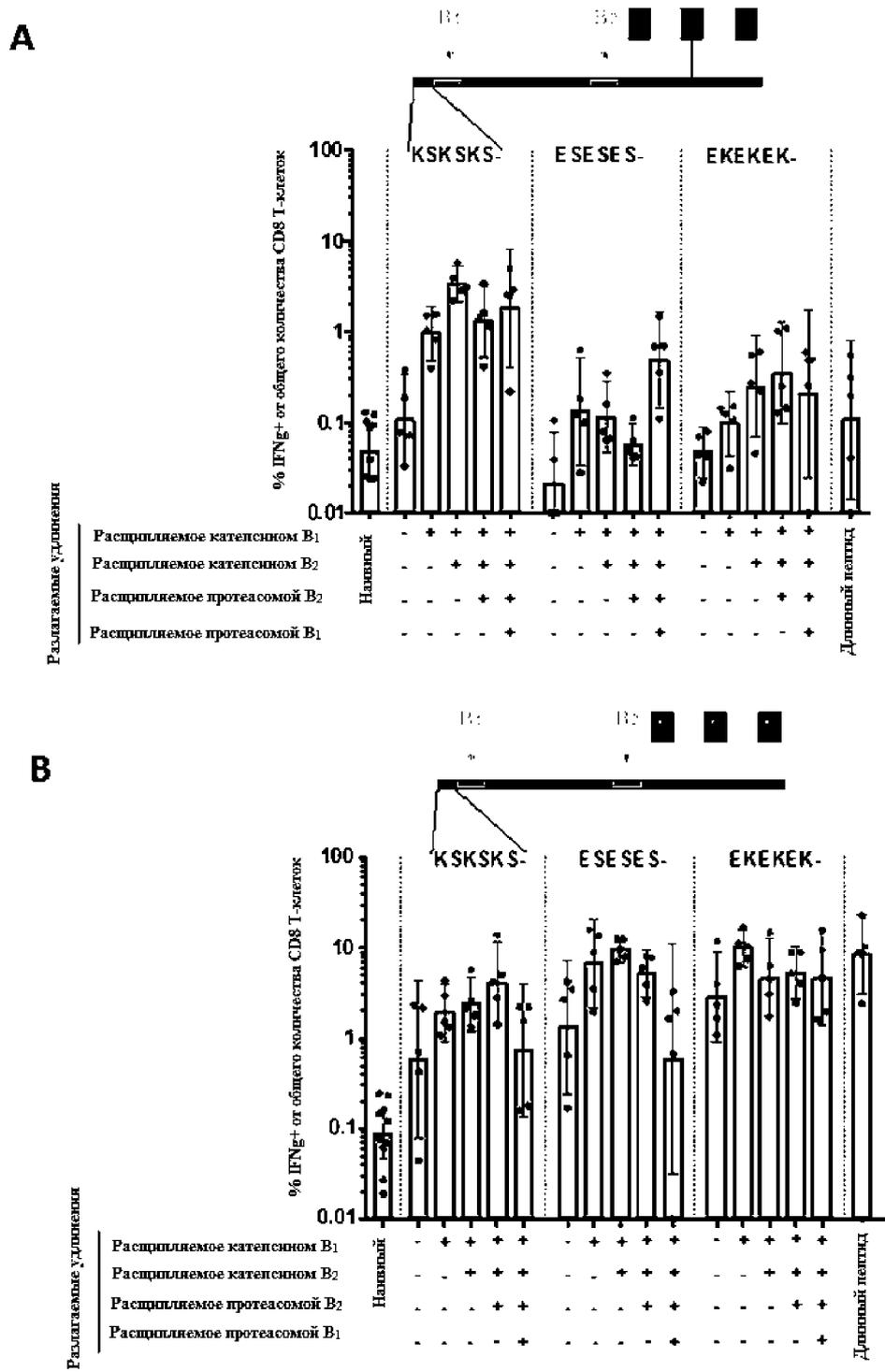


Фиг. 12

Последовательность <u>C-B1-A(L)-H</u> или <u>C-B1-A-B2(L)-H</u>	Расщепляемые катепсином N- или C- концевые удлинения		Расщепляемые протеасомой N- или C-концевые удлинения	
	N- концевое	C- концевое	C- концевое	N-концевое
<u>KSKSKS-GG-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	-	-	-	-
<u>KSKSKS-GGSLVR-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	-	-	-
<u>KSKSKS-GGSLVR-SSPYSLHYL-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	-	-
<u>KSKSKS-GGSLVR-SSPYSLHYL-GGSLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	+	-
<u>KSKSKS-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	-	-	+
<u>KSKSKS-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	-	+
<u>KSKSKS-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-GGSLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	+	+
<u>ESESES-GG-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	-	-	-	-
<u>ESESES-GGSLVR-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	-	-	-
<u>ESESES-GGSLVR-SSPYSLHYL-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	-	-
<u>ESESES-GGSLVR-SSPYSLHYL-GGSLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	+	-
<u>ESESES-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	-	-	+
<u>ESESES-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	-	+
<u>ESESES-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-GGSLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	+	+
<u>EKEKEK-GG-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	-	-	-	-
<u>EKEKEK-GGSLVR-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	-	-	-
<u>EKEKEK-GGSLVR-SSPYSLHYL-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	-	-
<u>EKEKEK-GGSLVR-SSPYSLHYL-GGSLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	+	-
<u>EKEKEK-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	-	-	+
<u>EKEKEK-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	-	+
<u>EKEKEK-GGSLVRYLLL-SSPYSLHYL-GGSLVR-(K'-DBCO)-2BXy3</u>	+	+	+	+

K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин

Фиг. 13

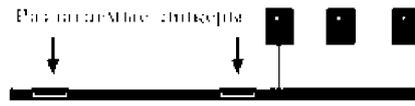


Фиг. 14

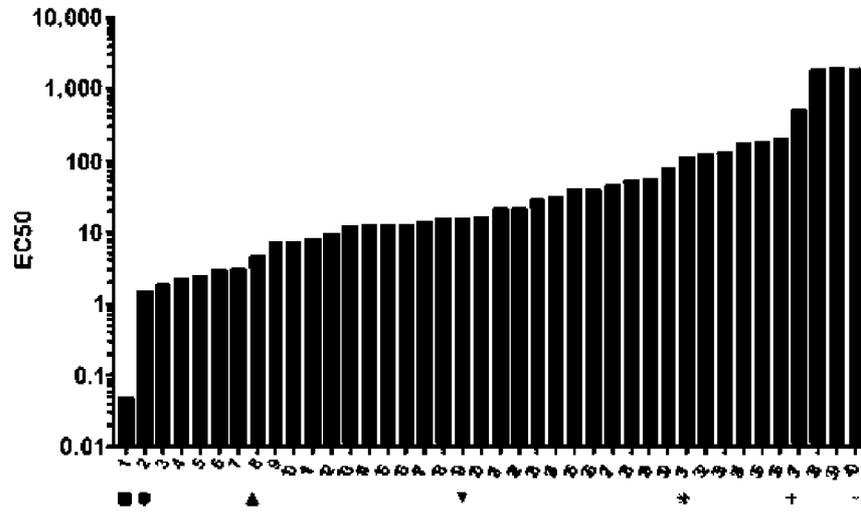
#	B1	B2	Антиген	ЕС50	Последовательность A или A-(L)-H, или A-B2-(L)-H, или BI-A-(L)-H, или BI-A-B2-(L)-H
1			-ASMTNMELM-	0,05	ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
2	SLVR	SPVZ	-ASMTNMELM-	1,54	SLVR-ASMTNMELM-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
3	SLVR	R	-ASMTNMELM-	1,93	SLVR-ASMTNMELM-R-(K'-DBCO)-2B3W2
4		SLVR	-ASMTNMELM-	2,26	ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCO)-2B3W2
5	SLVR		-ASMTNMELM-	2,50	SLVR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
6	SLVR	GP	-ASMTNMELM-	3,05	SLVR-ASMTNMELM-GP-(K'-DBCO)-2B3W2
7	SLVR	SPVR	-ASMTNMELM-	3,16	SLVR-ASMTNMELM-SPVR-(K'-DBCO)-2B3W2
8	SLVR	SLVR	-ASMTNMELM-	4,80	SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCO)-2B3W2
9	SLVR		-ASMTNMELM-	7,38	SLVR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
10	SPVR		-ASMTNMELM-	7,55	SPVR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
11	ELVR		-ASMTNMELM-	8,22	ELVR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
12	SPVR		-ASMTNMELM-	9,68	SPVR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
13	ELVL		-ASMTNMELM-	12,50	ELVL-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
14	ELVZ		-ASMTNMELM-	12,85	ELVZ-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
15	SLVR	KPLR	-ASMTNMELM-	12,91	SLVR-ASMTNMELM-KPLR-(K'-DBCO)-2B3W2
16	SLVR	GSG	-ASMTNMELM-	13,34	SLVR-ASMTNMELM-GSG-(K'-DBCO)-2B3W2
17	EPVZ		-ASMTNMELM-	14,55	EPVZ-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
18	KPLR		-ASMTNMELM-	16,11	KPLR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
19	SLVR	SLVZ	-ASMTNMELM-	16,18	SLVR-ASMTNMELM-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
20	KPLR		-ASMTNMELM-	16,98	KPLR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
21	ELVL		-ASMTNMELM-	21,98	ELVL-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
22	ELVZ		-ASMTNMELM-	22,08	ELVZ-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
23	RLVS		-ASMTNMELM-	29,31	RLVS-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
24	EPVZ		-ASMTNMELM-	31,77	EPVZ-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
25	SLVR	SLVL	-ASMTNMELM-	39,72	SLVR-ASMTNMELM-SLVL-(K'-DBCO)-2B3W2
26	SLVR	ELVR	-ASMTNMELM-	39,72	SLVR-ASMTNMELM-ELVR-(K'-DBCO)-2B3W2
27	SLVZ		-ASMTNMELM-	45,19	SLVZ-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
28	SLVR	EPVZ	-ASMTNMELM-	52,97	SLVR-ASMTNMELM-EPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
29	SPVZ		-ASMTNMELM-	56,62	SPVZ-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
30	SLVR	GGSLVZ	-ASMTNMELM-	78,70	SLVR-ASMTNMELM-GGSLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
31	SLVR	GGGG	-ASMTNMELM-	114,55	SLVR-ASMTNMELM-GGGG-(K'-DBCO)-2B3W2
32	SLVR	ELVZ	-ASMTNMELM-	129,42	SLVR-ASMTNMELM-ELVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
33	SLVL		-ASMTNMELM-	135,52	SLVL-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
34	SLVR	GGSLVR	-ASMTNMELM-	179,89	SLVR-ASMTNMELM-GGSLVR-(K'-DBCO)-2B3W2
35	GGGG		-ASMTNMELM-	187,07	GGGG-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
36	SLVR	ELVL	-ASMTNMELM-	212,81	SLVR-ASMTNMELM-ELVL-(K'-DBCO)-2B3W2
37	SLVR	dSLVR	-ASMTNMELM-	521,19	SLVR-ASMTNMELM-dSLVR-(K'-DBCO)-2B3W2
38	dSLVR		-ASMTNMELM-	1927,52	dSLVR-ASMTNMELM-(K'-DBCO)-2B3W2
39				Нет данных	GIPVHLELASMTNRELMSSIVHQVFPT
40				Нет данных	SSPYSLHYL

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктин; d = D аминокислоты

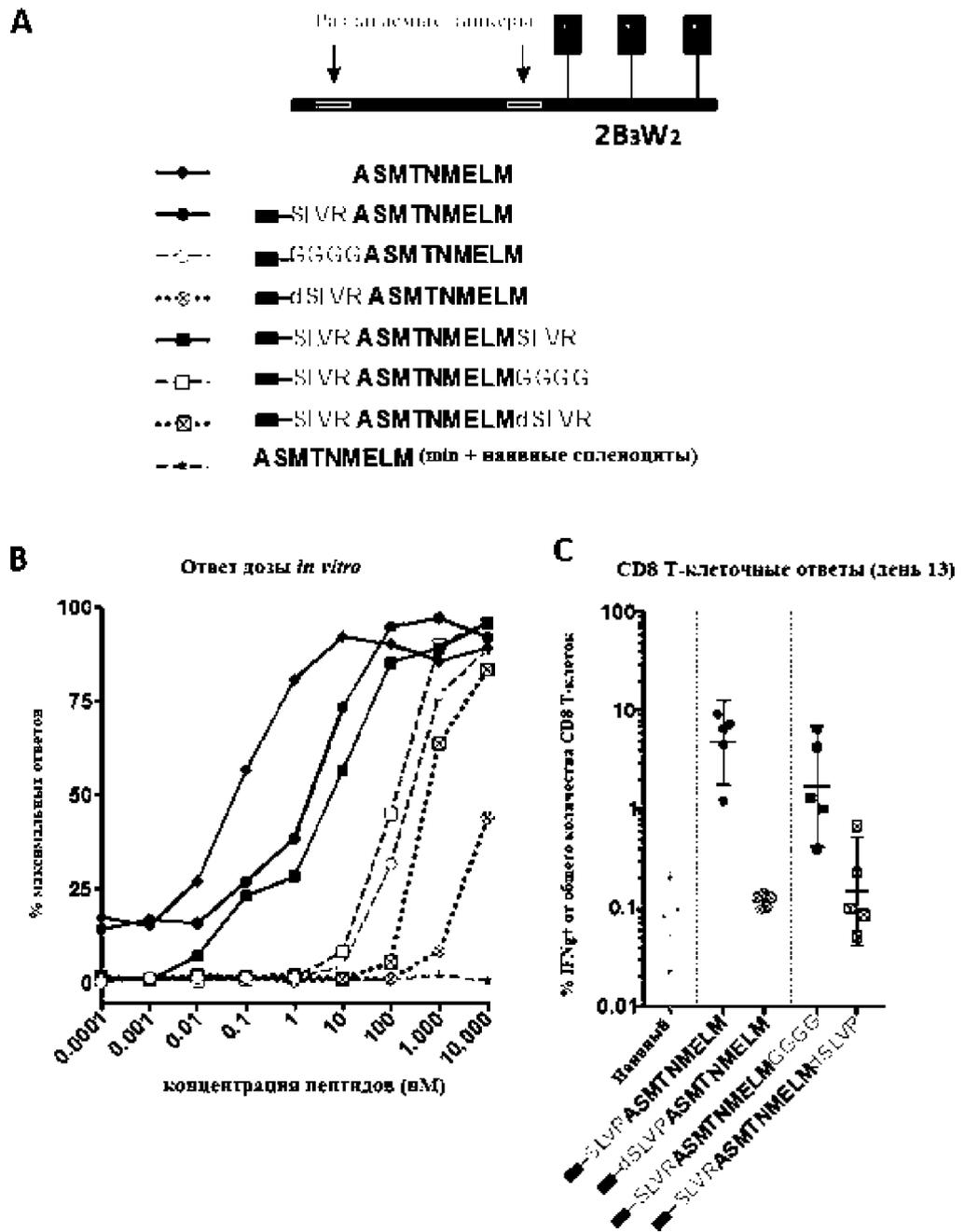
Фиг. 15



Определяется эффективность (EC50)



Фиг. 16



Фиг. 17

Последовательность C-A-(L)-H или C-BI-A-(L)-H, или C-A-B2-(L)-H, или C-BI-A-B2-(L)-H	Молекулярная масса	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
Ac-EEE-ELVL-KNHRNRQVI-GGESELVL-(K'-DBCO)-W5	4220,83	-0,68	-3	7,2
Ac-EEE-ELVL-KNHRNRQVI-GGELVL-(K'-DBCO)-W5	4004,65	-0,55	-2	46,9
Ac-SLVL-KNHRNRQVI-GGELVL-(K'-DBCO)-W5	3575,26	0,03	2	1624,0
Ac-SLVR-KNHRNRQVI-GGESELVL-(K'-DBCO)-W5	3834,49	-0,55	2	44,4
Ac-SLVL-KNHRNRQVI-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3533,22	0,17	3	101,7
Ac-SLVR-KNHRNRQVI-GGELVR-(K'-DBCO)-W5	3618,30	-0,39	3	12,5
Ac-SLVL-KNHRNRQVI-GGSLVR-(K'-DBCO)-W5	3576,25	-0,25	4	8,9
Ac-SLVR-KNHRNRQVI-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3576,26	-0,25	4	11,6
Ac-EK-SLVL-KNHRNRQVI-GGSLVR-(K'-DBCO)-W5	3833,53	-0,56	4	10,1
Ac-KLVR-KNHRNRQVI-GGELVL-(K'-DBCO)-W5	3659,39	-0,54	4	12,0
Ac-SLVL-KNHRNRQVI-GGKLVR-(K'-DBCO)-W5	3617,35	-0,41	5	7,5
Ac-SLVR-KNHRNRQVI-GGSLVR-(K'-DBCO)-W5	3619,29	-0,67	5	8,7
Ac-KLVR-KNHRNRQVI-GGELVR-(K'-DBCO)-W5	3702,41	-0,96	5	8,7
Ac-SLVR-KNHRNRQVI-GGKLVR-(K'-DBCO)-W5	3660,39	-0,82	6	7,8
Ac-KS-KLVR-KNHRNRQVI-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3832,60	-0,58	6	9,6
Ac-KE-KLVR-KNHRNRQVI-GGSLVR-(K'-DBCO)-W5	3917,67	-1,08	6	8,8
Ac-ESES-ELVL-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	4085,62	-0,39	-5	9,9
Ac-ES-ELVL-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3869,44	-0,23	-4	11,8
Ac-E-SLVL-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3740,31	-0,09	-3	8,9
Ac-EK-ELVL-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3910,53	-0,37	-3	8,9
Ac-SLVL-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3611,20	0,08	-2	72,0
Ac-EK-SLVL-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	3868,49	-0,25	-2	11,1
Ac-KLVR-SPERNDWEPL-GGKLVR-(K'-DBCO)-W5	3779,44	-1,01	2	18,2
Ac-KSKS-KLVR-SPERNDWEPL-GGSLVL-(K'-DBCO)-W5	4125,83	-0,77	2	24,5
Ac-KS-KLVR-SPERNDWEPL-GGKLVR-(K'-DBCO)-W5	3994,69	-1,13	3	11,0
Ac-KSKS-KLVR-SPERNDWEPL-GGSLVR-(K'-DBCO)-W5	4168,86	-1,10	3	11,5
Ac-KSKS-KLVR-SPERNDWEPL-GGKLVR-(K'-DBCO)-W5	4209,94	-1,22	4	8,9

K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктени; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18

Последовательность C- <u>A</u> -(L)-H или C- <u>BI</u> - <u>A</u> -(L)-H, или C- <u>A</u> -B2-(L)-H, или C- <u>BI</u> - <u>A</u> -B2-(L)-H	Молекулярная масса	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
Ac- <u>EEE</u> - <u>ELVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGESLVL</u> -(K'- DBCO)-2B5	5401,65	-0,68	-3	129,6
Ac- <u>EEE</u> - <u>ELVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGELVL</u> -(K'- DBCO)-2B5	5185,47	-0,55	-2	142,6
Ac- <u>SLVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGELVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	4756,08	0,03	2	126,7
Ac- <u>SLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGESLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B5	5015,31	-0,55	2	28,2
Ac- <u>SLVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	4714,04	0,17	3	28,1
Ac- <u>SLVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	4799,12	-0,39	3	30,8
Ac- <u>SLVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	4757,07	-0,25	4	19,1
Ac- <u>SLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	4757,08	-0,25	4	14,7
Ac- <u>EK</u> - <u>SLVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVR</u> -(K'-DBCO)- 2B5	5014,35	-0,56	4	14,2
Ac- <u>KLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGELVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	4840,21	-0,54	4	14,3
Ac- <u>SLVL</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGKIVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	4798,17	-0,41	5	15,3
Ac- <u>SLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	4800,11	-0,67	5	12,6
Ac- <u>KLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	4883,23	-0,96	5	13,2
Ac- <u>SLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGKIVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	4841,21	-0,82	6	16,3
Ac- <u>KS</u> - <u>KLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B5	5013,42	-0,58	6	19,7
Ac- <u>KE</u> - <u>KLVR</u> - <u>KNHRNRQVI</u> - <u>GGSLVR</u> -(K'-DBCO)- 2B5	5098,49	-1,08	6	18,7
Ac- <u>ESES</u> - <u>ELVL</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'- DBCO)-2B5	5266,44	-0,39	-5	96,3
Ac- <u>ES</u> - <u>ELVL</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B5	5050,26	-0,23	-4	104,4
Ac- <u>E</u> - <u>SLVL</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B5	4921,13	-0,09	-3	107,0
Ac- <u>EK</u> - <u>ELVL</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'- DBCO)-2B5	5091,35	-0,37	-3	109,1
Ac- <u>SLVL</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	4792,02	0,08	-2	1663,0
Ac- <u>EK</u> - <u>SLVL</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B5	5049,31	-0,25	-2	137,4
Ac- <u>KLVR</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGKIVR</u> -(K'-DBCO)- 2B5	4960,26	-1,01	2	33,4
Ac- <u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'- DBCO)-2B5	5306,65	-0,77	2	14,9
Ac- <u>KS</u> - <u>KLVR</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGKIVR</u> -(K'- DBCO)-2B5	5175,51	-1,13	3	20,6
Ac- <u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGSLVR</u> -(K'- DBCO)-2B5	5349,68	-1,10	3	14,4
Ac- <u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>SPERNDWEPL</u> - <u>GGKIVR</u> -(K'- DBCO)-2B5	5390,76	-1,22	4	20,2

K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклоокстин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность C- <u>A</u> -(L)-H или C- <u>BI-A</u> -(L)-H, или C- <u>A-B2</u> -(L)-H, или C- <u>BI-A-B2</u> -(L)-H	Молекулярная масса	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
Ac- <u>KS</u> - <u>KLVR</u> - <u>VVIAIFIL</u> - <u>GGELVR</u> -(K'-DBCO)-W5	3753,67	3,87	3	220,0
Ac- <u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>VVIAIFIL</u> - <u>GGELVR</u> -(K'-DBCO)-W5	3968,91	3,87	4	2329,0
Ac- <u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>VVIAIFIL</u> - <u>GGSLVR</u> -(K'-DBCO)-W5	3926,87	3,87	5	1370,0
Ac- <u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>VVIAIFIL</u> - <u>GGKLR</u> -(K'-DBCO)- W5	3967,98	3,87	6	43,4
<u>EKE</u> - <u>KLVL</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- W5	3955,76	0,31	0	1368,0
<u>EK</u> - <u>SLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-W5	3913,64	0,31	1	1518,0
<u>KE</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)-W5	3869,67	0,31	2	52,1
<u>KE</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- W5	3954,74	0,31	2	19,2
<u>KS</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)-W5	3827,63	0,31	3	26,8
<u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGELVL</u> -(K'-DBCO)- W5	4084,93	0,31	3	19,1
<u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- W5	4042,88	0,31	4	10,2
<u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- W5	4127,95	0,31	4	8,8
<u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGSLVR</u> -(K'-DBCO)- W5	4085,91	0,31	5	9,0
<u>KSKS</u> - <u>KLVR</u> - <u>ASMTNMELM</u> - <u>SSGGKLR</u> -(K'-DBCO)- W5	4127,02	0,31	6	8,2
Ac- <u>ESESES</u> - <u>ELVL</u> - <u>AKFVAAWTLKAAA</u> - <u>GGESESLVL</u> - (K'-DBCO)-W5	4665,35	0,94	-4	2000
Ac- <u>EKE</u> - <u>KLVL</u> - <u>AKFVAAWTLKAAA</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'- DBCO)-W5	4144,00	0,94	2	1414,0
Ac- <u>EK</u> - <u>ELVL</u> - <u>AKFVAAWTLKAAA</u> - <u>GGKLR</u> -(K'- DBCO)-W5	4099,96	0,94	3	25,0
Ac- <u>EKE</u> - <u>KLVL</u> - <u>AKFVAAWTLKAAA</u> - <u>GGKLR</u> -(K'- DBCO)-W5	4228,14	0,94	4	6,7
Ac- <u>KE</u> - <u>KLVR</u> - <u>AKFVAAWTLKAAA</u> - <u>GGSLVL</u> -(K'- DBCO)-W5	4057,92	0,94	4	41,2

K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг.18 продолжение

Последовательность C- <u>A</u> -(L)-H или C- <u>BI-A</u> -(L)-H, или C- <u>A</u> -B2- (L)-H, или C- <u>BI-A</u> -B2-(L)-H	Молекулярная масса	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
Ac- <u>KS-KLVR-VVIAIFIII</u> -GGELVR-(K'-DBCO)-2B5	4934,49	3,87	3	791,1
Ac- <u>KSKS-KLVR-VVIAIFIII</u> -GGELVR-(K'-DBCO)-2B5	5149,73	3,87	4	981,8
Ac- <u>KSKS-KLVR-VVIAIFIII</u> -GGSLVR-(K'-DBCO)-2B5	5107,69	3,87	5	1338,0
Ac- <u>KSKS-KLVR-VVIAIFIII</u> -GGKLVR-(K'-DBCO)-2B5	5148,80	3,87	6	41,1
<u>EKE-KLVL-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5136,58	0,31	0	1362,0
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5094,46	0,31	1	1381,0
<u>KE-KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5050,49	0,31	2	1115,0
<u>KE-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5135,56	0,31	2	1390,0
<u>KS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5008,45	0,31	3	45,5
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5265,75	0,31	3	603,6
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5223,70	0,31	4	32,9
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5308,77	0,31	4	13,0
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5266,73	0,31	5	16,0
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGKLVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5307,84	0,31	6	16,4
Ac- <u>ESESES-ELVL-AKFVAAWTLKAAA-GGESELVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5846,17	0,94	-4	618,5
Ac- <u>EKE-KLVL-AKFVAAWTLKAAA-GGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5324,82	0,94	2	88,5
Ac- <u>EK-ELVL-AKFVAAWTLKAAA-GGKLVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5280,78	0,94	3	1560,0
Ac- <u>EKE-KLVL-AKFVAAWTLKAAA-GGKLVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	5408,96	0,94	4	222,8
Ac- <u>KE-KLVR-AKFVAAWTLKAAA-GGSLVL</u> -(K'-DBCO)-2B5	5238,74	0,94	4	75,4
<u>ESGSGSGS-SLVR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR</u> -(K'-DBCO)-2B5	6760,30	0,52	1	2076,0
<u>ESGSGSGS-SLVR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-SGSGS</u> -(K'-DBCO)-2B5	7135,63	0,52	1	1725,0
<u>ESGSGSGS-SLVR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-LLLL</u> -(K'-DBCO)-2B5	7326,09	0,52	1	1539,0
<u>EEEEEEE-SLVR-VLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR</u> -(K'-DBCO)-2B5	6931,40	0,75	-7	1214,0
<u>RRRRR-KPLR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-LLLL</u> -(K'-DBCO)-2B5	7497,52	0,52	8	24,5
<u>EEEEEEE-SLVR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-LLLL</u> -(K'-DBCO)-2B5	7710,43	0,52	-6	128,1

K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность C- <u>A</u> -(L)-H или C- <u>B1-A</u> -(L)-H, или C- <u>A-B2</u> -(L)-H, или C- <u>B1-A-B2</u> -(L)-H	Молекулярная масса	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
EKE- <u>KLVL-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5358,48	0,31	0	800,3
EK- <u>SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5316,36	0,31	1	1042,0
KE- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5272,39	0,31	2	1146,0
KE- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5357,46	0,31	2	1322,0
KS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5230,35	0,31	3	1138,0
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVL</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5487,65	0,31	3	1070,0
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5445,60	0,31	4	36,7
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5530,67	0,31	4	100,5
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVR</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5488,63	0,31	5	74,4
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGKLR</u> -(K'-DBCO)- 2B2W8	5529,74	0,31	6	20,6
EKE- <u>KLVL-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5376,58	0,31	0	1464,0
EK- <u>SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5334,46	0,31	1	1752,0
KE- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5290,49	0,31	2	1572,0
KE- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5375,56	0,31	2	2085,0
KS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5248,45	0,31	3	1824,0
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVL</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5505,75	0,31	3	216,7
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVL</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5463,70	0,31	4	51,5
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5548,77	0,31	4	27,4
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGSLVR</u> -(K'-DBCO)- 2BXy5	5506,73	0,31	5	26,5
KSKS- <u>KLVR-ASMTNMELM-SSGGKLR</u> -(K'- DBCO)-2BXy5	5547,84	0,31	6	21,2

K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность С-Δ-(L)-Н или С-В1-Δ-(L)-Н, или С-Δ-В2-(L)-Н, или С-В1-Δ-В2-(L)-Н	Молекулярная масса	GRAVY пятичного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
KKKK-VR-RCSDSDGLAPPQRLIRVEGNLRVEY- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	6148,74	-0,69	6	17,8
KKKKK-VR-MCNSSCMGGMNRSPII.TITLEDSS- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	6093,83	0,22	6	144,8
KKKKKK-VR- PPEVGSDCITTHCNMYMCNSSCMGGM-SPVZ-(K'- DBCO)-2B3W2	6198,93	-0,09	6	37,4
KKKK-VR-PGETVRHCSAPENPIFRFSLHSYL-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	6149,73	-0,40	6	20,5
KKK-VR-VGSDCTTTHYNYICNSSCMGGMNRR- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	5959,53	-0,37	6	40,6
K-VR-LKKMWKSPNGITQNILGGTVFREPI-SPVZ-(K'- DBCO)-2B3W2	5748,41	-0,31	6	19,5
KKKKK-VR-SYLDSGIHSGATATAPSLSGKGNPE- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	5850,28	-0,46	6	17,0
KKKKKK-VR-TCLLSYTTNAFSGEYIPTVFDNYS- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	6381,01	0,22	6	24,5
KKKK-VR-IDGPHCVKTCPAVVMGENNTLVWKY- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	6079,80	0,05	6	16,9
KKKKKKKKK-VR- EEDVEDGGDRWSTPYVATLSLHSLF-SPVZ-(K'- DBCO)-2B3W2	6769,41	-0,51	6	57,7
KKKK-VR-KMQITPETPGRIRVLPFESPSDYS-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	6167,78	-0,82	6	16,8
KK-VR-RSGPDLRRPPTPVPWPSTSLGTPLT-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	5734,26	-0,78	6	18,4
KKKKKKKKK-VR- YEDNDEVHIEVHITPRNTEAVTLNFR-SPVZ-(K'- DBCO)-2B3W2	6816,43	-1,06	6	57,6
KKKKK-VR-INCSLDWLMVSVPLAESRNL.YIFA- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	6275,04	0,72	6	25,6
K-VR-ALYTKMVPAAVSRSEFWHRFYKVVH-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	6007,61	-0,24	6	18,1
KK-VR-VCPSLPYFAAKLNLSVTDASRRLC-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	5801,86	0,23	6	83,2
KKK-VR-EAGKVYLKAPMIMNGVCVIWKGWID- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	5998,81	0,47	6	29,3
KKKK-VR-SRSASHRSTREAFETYDIETLKVID-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	6234,76	-0,60	6	91,5
K-VR-AIYHYRTALKLYSRHASALNNLGLT-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	5767,29	-0,12	6	932,2
KKKKKKK-VR-TSLTACLVDQSLLLDCRHENTSSP- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	6266,01	-0,11	6	40,9
KKKKKKK-VR- GFOALSEGCTPYDINQMLNCVGDHQ-SPVZ-(K'- DBCO)-2B3W2	6430,09	-0,36	6	16,8
KKKK-VR-MAEALKEALAPVPIFAAAOORGP- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	5781,46	0,18	6	17,0
KKKK-VR-RCSDSDGLAPPQRLIRVEGNLRVEY- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	6293,38	-0,69	6	42,7
KKKKK-VR-MCNSSCMGGMNRSPII.TITLEDSS- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	6238,47	0,22	6	28,5
KKKKKK-VR- PPEVGSDCITTHCNMYMCNSSCMGGM-SPVZ-(K'- DBCO)-2BXy3W2	6343,57	-0,09	6	16,4
KKKK-VR-PGETVRHCSAPENPIFRFSLHSYL-SPVZ- (K'-DBCO)-2BXy3W2	6294,37	-0,40	6	17,6
KKK-VR-VGSDCTTTHYNYICNSSCMGGMNRR- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	6104,17	-0,37	6	21,2
K-VR-LKKMWKSPNGITQNILGGTVFREPI-SPVZ-(K'- DBCO)-2BXy3W2	5893,05	-0,31	6	17,5
KKKKK-VR-SYLDSGIHSGATATAPSLSGKGNPE- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	5994,92	-0,46	6	17,1
KKKKKK-VR-TCLLSYTTNAFSGEYIPTVFDNYS- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	6525,65	0,22	6	1281,9
KKKK-VR-IDGPHCVKTCPAVVMGENNTLVWKY- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	6224,44	0,05	6	17,5
KKKKKKKKK-VR- EEDVEDGGDRWSTPYVATLSLHSLF-SPVZ-(K'- DBCO)-2BXy3W2	6914,05	-0,51	6	29,3
KKKK-VR-KMQITPETPGRIRVLPFESPSDYS-SPVZ- (K'-DBCO)-2BXy3W2	6312,42	-0,82	6	17,4
KK-VR-RSGPDLRRPPTPVPWPSTSLGTPLT-SPVZ- (K'-DBCO)-2BXy3W2	5878,90	-0,78	6	16,9
KKKKKKKKK-VR- YEDNDEVHIEVHITPRNTEAVTLNFR-SPVZ-(K'- DBCO)-2BXy3W2	6961,07	-1,06	6	36,4
KKKKK-VR-INCSLDWLMVSVPLAESRNL.YIFA- SPVZ-(K'-DBCO)-2BXy3W2	6419,68	0,72	6	91,4
K-VR-ALYTKMVPAAVSRSEFWHRFYKVVH-SPVZ- (K'-DBCO)-2BXy3W2	6152,25	-0,24	6	171,3
KK-VR-VCPSLPYFAAKLNLSVTDASRRLC-SPVZ- (K'-DBCO)-2BXy3W2	5946,50	0,23	6	30,7

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность C-Δ-(L)-H или C-B1-Δ-(L)-H, или C-Δ-B2-(L)-H, или C-B1-Δ-B2-(L)-H	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
KKK-VR-EAGKVYLKAPMIMNGVCVIVKGWID-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,47	6	57,3
KKKK-VR-SRSASHRSTRFAETFYDIETLKVID-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,60	6	185,0
K-VR-ΔIVHYRTALKLYSRHASALNNLGTL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,12	6	287,9
KKKKKK-VR-TSLTACLVDQSLLLDCRHENTTSSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,11	6	60,9
KKKKKKK-VR-GFQALSEGCTPYDINQMLNCVGDHQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,36	6	26,8
KKKK-VR-MAEALKEALAPVIPFAAAQQRGP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,18	6	54,5
KKKK-VR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,52	6	33,8
KKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,43	6	177,9
KKKKKKK-VR-EAGQSLVISASIVFNLELEGDYR-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,54	6	56,0
KKKKK-VR-SKLSFMAPIDHTTMSDDARTELFERS-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,31	6	26,2
KKKKKKK-VR-DFTGSNGDPSSPYSLYLSPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,82	6	18,4
KKKKK-VR-KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,38	6	17,8
KKKKKKKK-VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,21	6	20,2
KKKKKKK-VR-SKLSFMAPIDHTTMSDDARTELFERS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,31	8	20,8
KKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,43	8	20,8
KKKKKKKKK-VR-DFTGSNGDPSSPYSLYLSPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,82	8	19,0
KKKKKKKKK-VR-EAGQSLVISASIVFNLELEGDYR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,54	8	20,0
KKKKKKK-VR-KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,38	8	19,4
KKKKKKKKK-VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,21	8	19,8
KKKKKK-VR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,52	8	17,6
KKKKKKKKKK-VR-ETLGEISFLSLDLHFDGDYSAGD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,02	6	79,6
KKKKKKKKK-VR-DDEGDYTCQFTHVENGTYIVTATR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,90	6	25,6
KKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,43	6	24,3
KKKK-VR-VVDRNPQFLDPVLA YLMKGLCEKPLAS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,20	6	17,2
KK-VR-NIEGIDKLTQLKPPFLVNNKINKIENI-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,47	6	25,1
VR-MAAALTFRRLLTPRAARGFGVQVS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,56	6	48,7
VR-GRGHLLGRLAAIVGKQVLLGRKVVVVVR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,66	8	46,4
KKK-VR-LKSSPERNDWEPLDKKVDTRKYRAE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-1,91	6	16,2
KKKKKKKKKKK-VR-ETLGEISFLSLDLHFDGDYSAGD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,02	8	17,2
KKKKKKKKK-VR-DDEGDYTCQFTHVENGTYIVTATR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,90	8	27,0
KKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,43	8	22,2
KKKKKK-VR-VVDRNPQFLDPVLA YLMKGLCEKPLAS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,20	8	17,0
KKKK-VR-NIEGIDKLTQLKPPFLVNNKINKIENI-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,47	8	26,4
KK-VR-MAAALTFRRLLTPRAARGFGVQVS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,56	8	102,5
VR-GRGHLLGRLAAIVGKQVLLGRKVVVVVR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,66	8	43,4
KKK-VR-LKSSPERNDWEPLDKKVDTRKYRAE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-1,91	7	22,8
KKKKKKKKK-VR-QGTDVIAIFILAMSFVPASVVF-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	2,00	9	173,0
KD-VR-MAAALTFRRLLTPRAARGFGVQVS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,56	6	18,6

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность С-А-(L)-Н или С-В1-А-(L)-Н, или С-А-В2-(L)-Н, или С-В1-А-В2-(L)-Н	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
KKKKK-VR-LCSEPMFTFVYPTIFPLRETPMAGL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,56	6	18,4
KD-VR-AWHTNLSRKILRMSPLLAKFHQFLV-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,15	6	16,4
KKKKK-VR-KGFELLYQPEVVHLYLSLLTESRNF-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,03	6	18,2
KKK-VR-SFVRQLNMYGFRNVVHIESGIKQE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,14	6	2000,0
KK-VR-MAAALTFERRLLTPRAARGFVQVS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,56	8	19,4
KKKKKKK-VR-LCSEPMFTFVYPTIFPLRETPMAGL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,56	8	17,6
KK-VR-AWHTNLSRKILRMSPLLAKFHQFLV-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,15	8	17,2
KKKKKKK-VR-KGFELLYQPEVVHLYLSLLTESRNF-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,03	8	18,0
KKKKK-VR-SFVRQLNMYGFRNVVHIESGIKQE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,14	8	11,4
KKK-VR-LOGDVAFGHSNLFIRSPRTL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,00	6	926,4
KKKK-VR-ALEKIAFLPFAYLVDQWRWG-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,36	6	47,6
KKKKKKK-VR-GSSAEESHLSCLNWSTLVPL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,12	6	105,6
KKKK-VR-MLWLALGPF CGMENQVL VIR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	1,04	6	592,3
KKKK-VR-TERIYSLFNLSMGKLEKMQE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,57	6	2000,0
KKK-VR-ALGLRHLVVVGHNHNVGLV-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,98	6	2000,0
KKKKKKK-VR-AELINCOADVSAVDDHGKSA-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,19	6	71,4
KKKKDK-VR-MAAALLPLAFTLLSGQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	1,63	6	21,0
KD-VR-LSGWWLWKRCNPLATKVKV-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,10	6	4270,1
KKKKK-VR-SHRNSLDTNLISMLFQNLSE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,41	6	102,6
KK-VR-KVGTAWKQVYFLGVPYAAP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,45	6	75,7
KK-VR-IKIVRLTTGSAYQFRVCAEN-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,14	6	4055,8
KKKKK-VR-LOGDVAFGHSNLFIRSPRTL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,00	8	17,6
KKKKKKK-VR-ALEKIAFLPFAYLVDQWRWG-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,36	9	17,8
KKKKKKKK-VR-GSSAEESHLSCLNWSTLVPL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,12	8	16,0
KKKKKKKK-VR-MLWLALGPF CGMENQVL VIR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	1,04	10	14,8
KKKKKKK-VR-TERIYSLFNLSMGKLEKMQE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,57	8	24,6
KKKKKKK-VR-ALGLRHLVVVGHNHNVGLV-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,98	10	38,9
KKKKKKKKK-VR-AELINCOADVSAVDDHGKSA-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,19	8	18,8
KKKKKKKK-VR-MAAALLPLAFTLLSGQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	1,63	10	17,2
KK-VR-LSGWWLWKRCNPLATKVKV-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,10	8	13,2
KKKKKKK-VR-SHRNSLDTNLISMLFQNLSE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,41	8	17,8
KKKKK-VR-KVGTAWKQVYFLGVPYAAP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,45	9	15,8
KKKK-VR-IKIVRLTTGSAYQFRVCAEN-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,14	8	27,9
KKKK-VR-FVVKAYLPVNESFAFTADLRNSNTGGQAG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,10	6	278,4
KK-VR-TAKSVMCTYSPPLDKLFCQLAKTCPVQG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,11	6	17,9
KK-VR-ANFESGKHKYRQTAMFTATMPPAVERLG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,63	6	20,8
KKKK-VR-VVDRNPQFLDPVLAAYLMLGCEKPLASG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,18	6	16,2
KKKKKKK-VR-NEVAPLEWLR YFDKKELELM LCGMQEIG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,23	6	17,6

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензозинклоксия; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность C-Δ-(L)-H или C-B1-Δ-(L)-H, или C-Δ-B2-(L)-H, или C-B1-Δ-B2-(L)-H	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
KKKKKK-VR-SSPDEVALVEGVQSLGFTYLRKLDNYMG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,13	6	59,9
KK-VR-PKPDFSQLQRNLPSPNPRVTRFHINWDG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-1,03	6	18,0
KKKK-VR-LILISTNGSFIRLLDAFKGVVMHTFGGG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,91	7	27,3
KKKKKK-VR-STANYNTSHLNNDVWQIFENPVDWKEKG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-1,17	6	17,6
KK-VR-RVDQKTLHNLLRKVVPSFSAEIERLNQG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,59	6	18,8
KKKK-VR-IPSGTTILNCFHDVLSGKLSGGSPGVP-G-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,29	6	94,5
KKK-VR-DSGSPFPAAVILRDALHMARGLKYLHQ-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,05	6	17,4
KK-VR-HLTQQLDTYILKNVVAFSRIDKYRQLPG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,56	6	43,5
KKKK-VR-CGTAFFINFAIYHHASRAIPFGTMVAG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,93	7	2000,0
KKKK-VR-GPDGLALPNNYCDVCLGDSKINKKTGQG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,62	6	19,0
KK-VR-ELINFKRKRVAAFQKNLIEMSELEKHG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,48	6	2000,0
KKK-VR-NREKMKGELGMMMLILQNVIQITTPGEG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,56	6	2000,0
KKK-VR-EFKHIKAFDRIFANNPGPMVVFATPGMG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,13	6	19,0
KKKKKKKK-VR-NHSGLVTFQAFIDVMSRETTDTDTADQG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,49	6	2000,0
D-VR-GRGHLLGRLAAIVGKQVLLGRKVVVVRG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,62	7	53,8
KKK-VR-EKFSMDHKGTIAMQNTTQLRSRYELTG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,99	6	2000,0
KKKKK-VR-SGCYFMVAVAHVAAFLLEDRAVCVERFG-SLVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,98	6	2000,0
KKKK-VR-REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,96	6	19,0
KKKKKKKKKK-VR-PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,82	8	18,0
KKKK-VR-TAKSVMCTYSPPLDKLFCQLAKTCPVQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,13	8	20,4
KKKKKK-VR-VVDRNPQFLDPVLA YLMKGLCEKPLAS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,20	8	17,0
KKKKKKKKK-VR-SSPDEVALVEGVQSLGFTYLRKLDNYM-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,12	8	31,1
KKKKKK-VR-IPSGTTILNCFHDVLSGKLSGGSPGVP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,32	8	22,6
KKKKK-VR-DSGSPFPAAVILRDALHMARGLKYLHQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,03	8	17,0
KKKKK-VR-NREKMKGELGMMMLILQNVIQITTPGE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,57	8	171,7
KKKKK-VR-EKFSMDHKGTIAMQNTTQLRSRYELT-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-1,01	8	33,4
KKKKKK-VR-REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,96	8	21,0
KKKKKKK-VR-YMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHH-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,20	8	25,8
KKKKK-VR-DTKQAQELARSYGPIETSAKTRQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,95	8	18,2
KKK-VR-QRVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-1,01	8	2000,0
KKKKKKK-VR-MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,65	9	16,6
KKKK-VR-QACAHFFSLISKANVDVLPRLSLER-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,03	8	21,6
KKKKK-VR-YQKACSAFQNVSGLEYFEKIKITFLG-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,16	8	17,0
KKKKKKK-VR-LARQMDLVNEIPFTYEQLSIFKHKL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,13	8	24,4
KKKKKK-VR-RLGLGLOGGIPNGYLVLDNFVREA-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,21	8	17,6
KK-VR-LKYSKQKMNAAIAIALVACYLRGGG-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,22	8	17,8
KKKKK-VR-LRALSQHNVSMDIATFKRLQVDSL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	0,16	8	331,7
KKKKKKK-VR-LGSCGSPICSRSELLLLSLGWIPR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	1,00	10	18,0

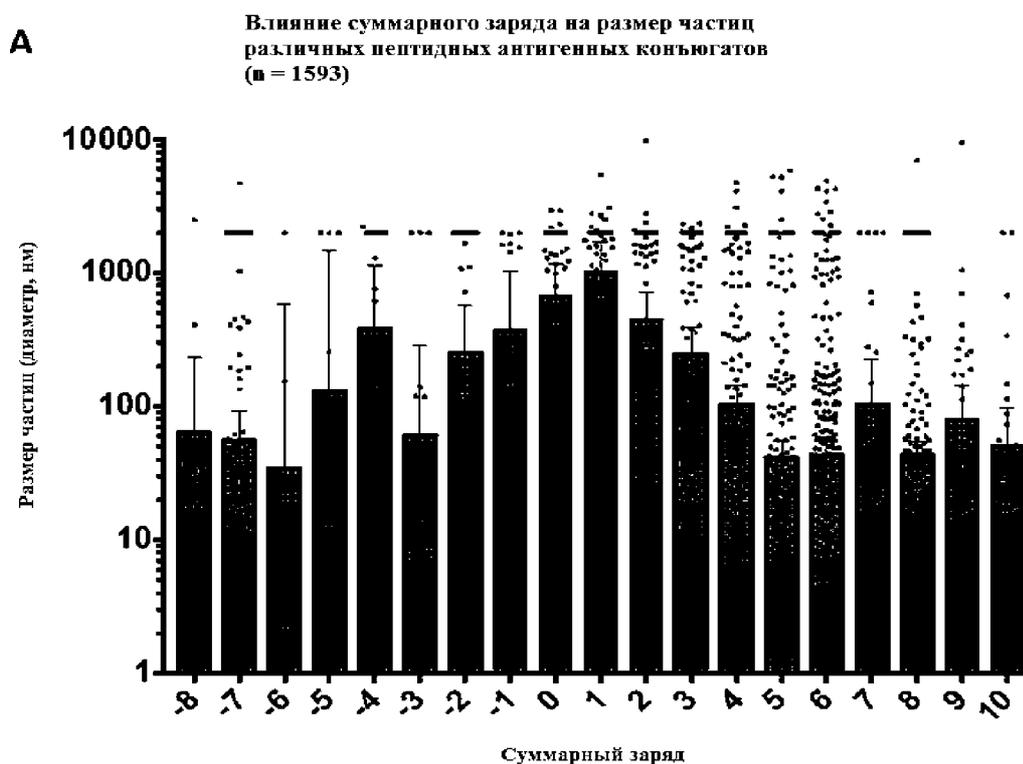
Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение

Последовательность C-A(L)-H или C-B1-A(L)-H, или C-A-B2(L)-H, или C-B1-A-B2(L)-H	GRAVY нативного антигена	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)
<u>KKKKKKKK</u> -VR-LSE \overline{D} VKSYYTVHLLQLENINTGETRTI- SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-0,40	8	17,8
<u>KKKKKKKK</u> -VR-GVPESPASFLNFLFKVRESGCLTPD-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	0,06	8	18,2
<u>KKKKKKKKKK</u> -VR-NDYINASLVDIEEAQRSYILTQGP-SPVZ- (K'-DBCO)-2B3W2	-0,44	8	21,8
<u>KKKK</u> -VR-DVNVKQLLLNMRKYRMGLIQTDPDQL-SPVZ-(K'- DBCO)-2B3W2	-0,38	8	16,8

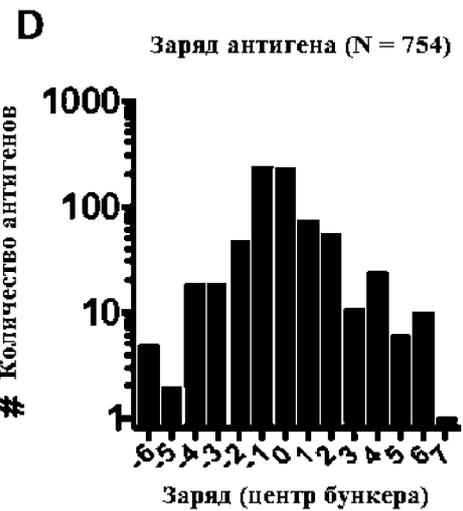
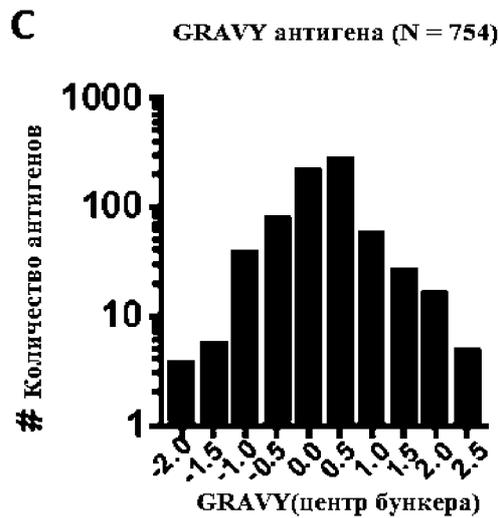
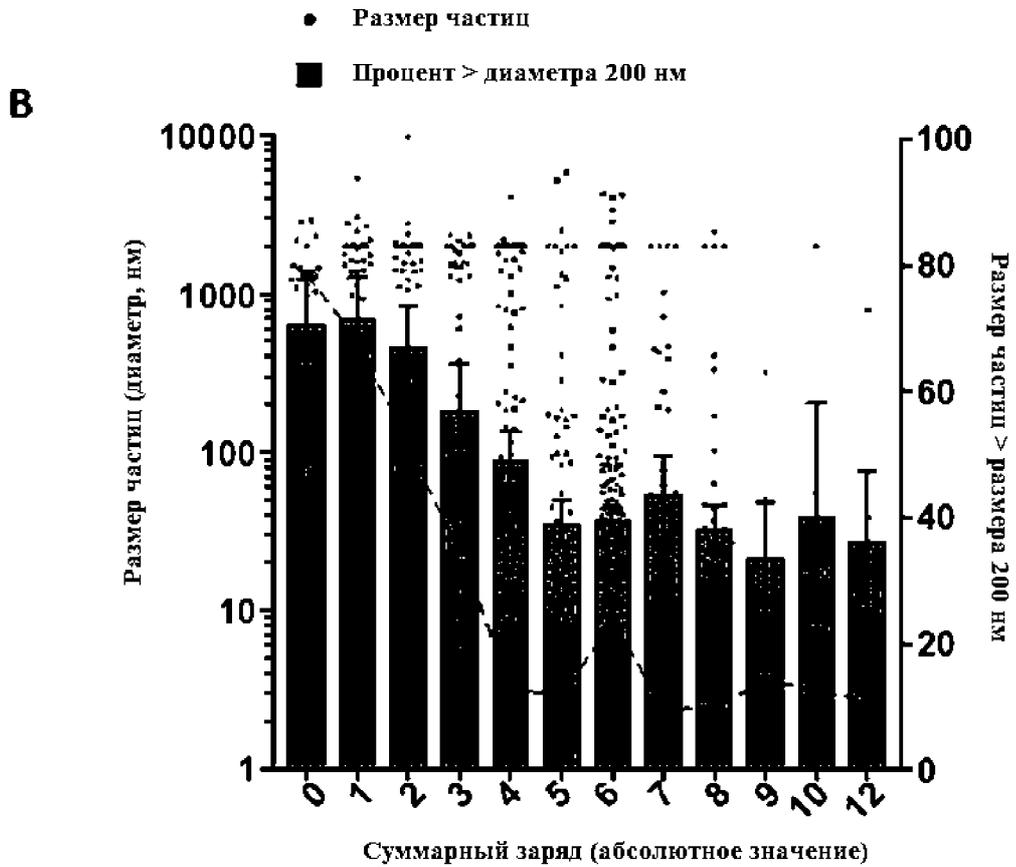
Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин; Ac = N-концевой ацетил

Фиг. 18 продолжение



Фиг. 19

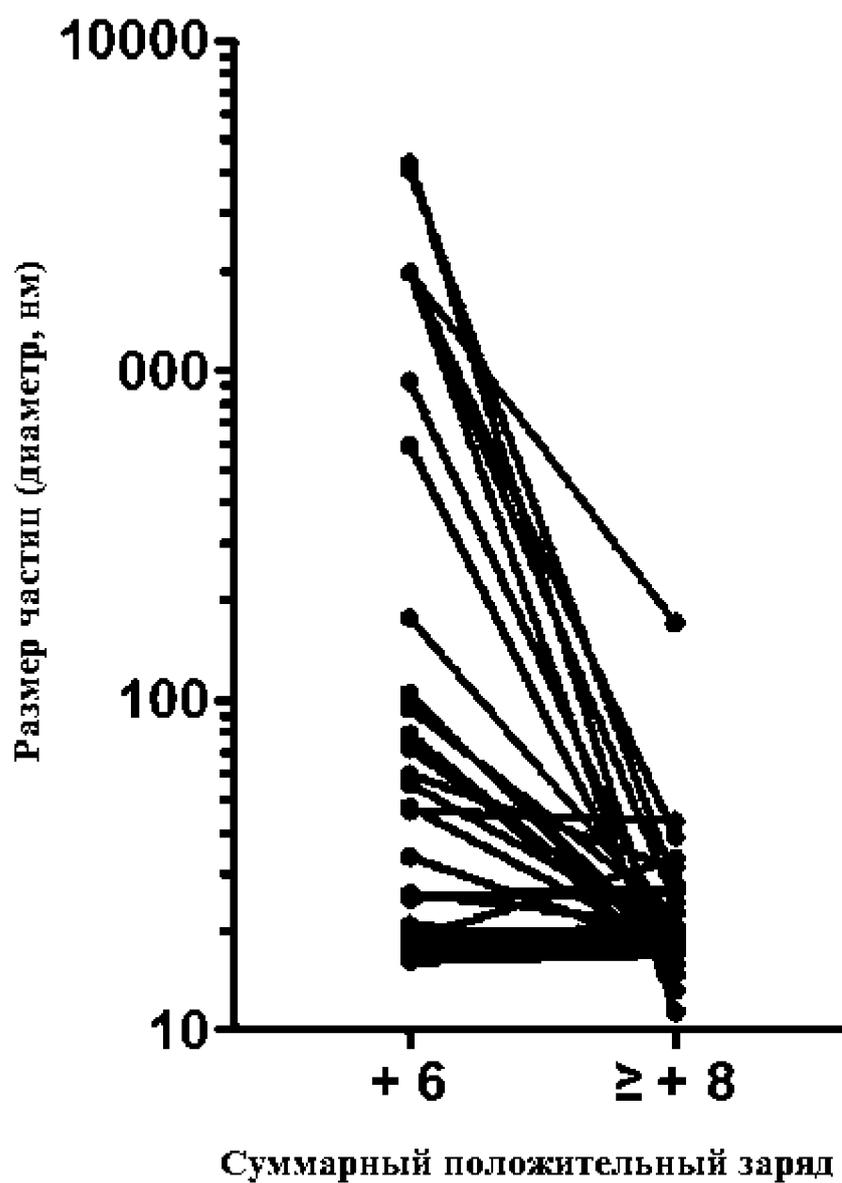
Влияние суммарного заряда на размер частиц различных пептидных антигенных конъюгатов (N = 754)



Фиг. 19 продолжение

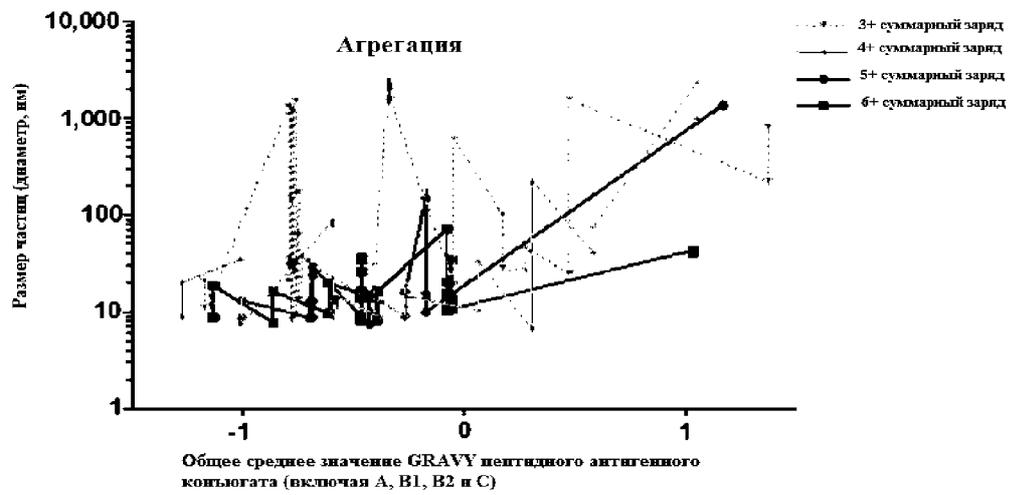
E

**Антигены LP (N = 39), доставляемые
в виде SNP-7/8a с суммарным зарядом +6 или +8**

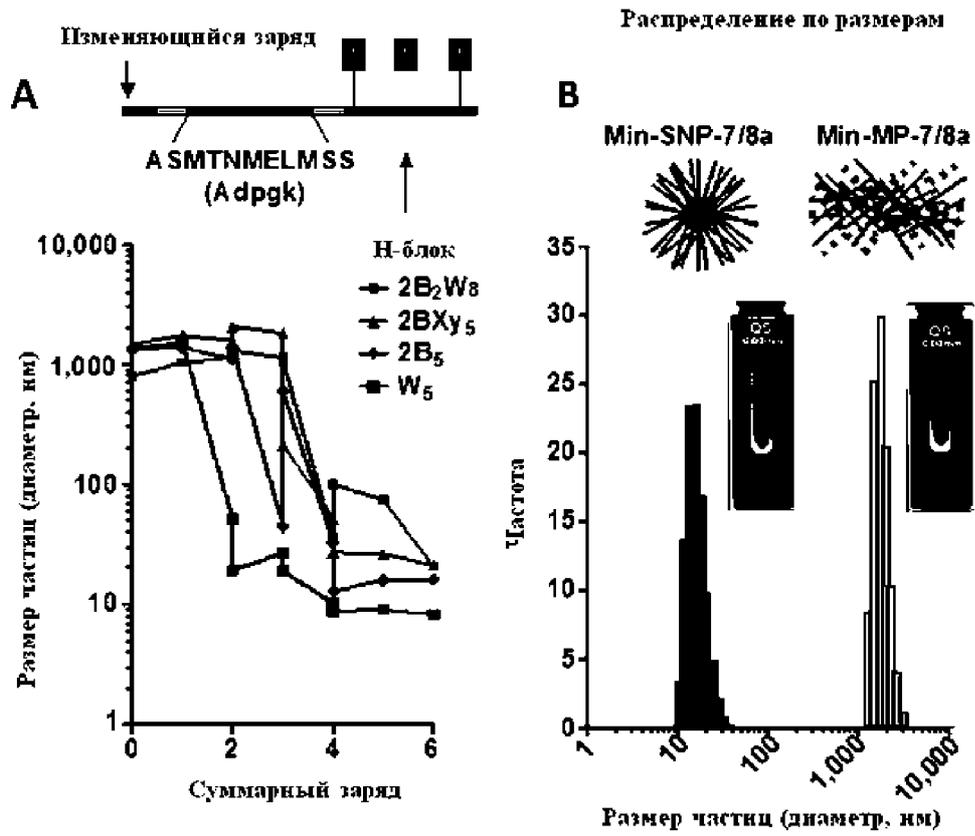


Фиг. 19 продолжение

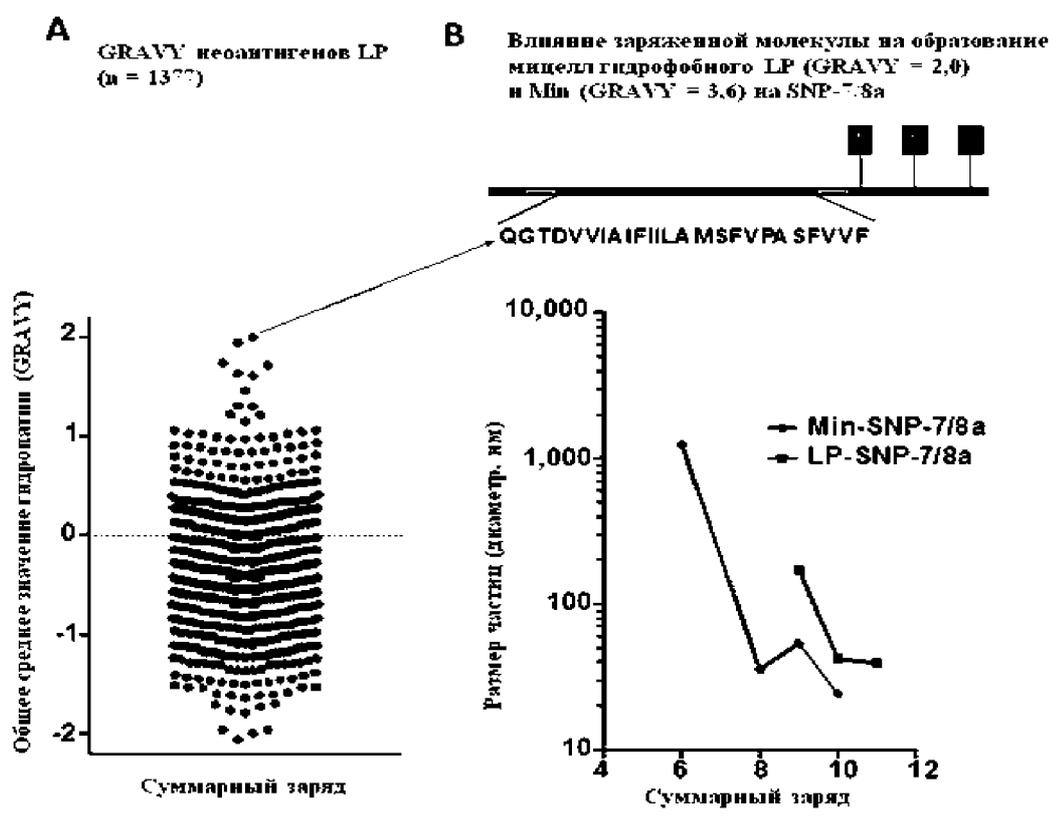
F



Фиг. 19 продолжение

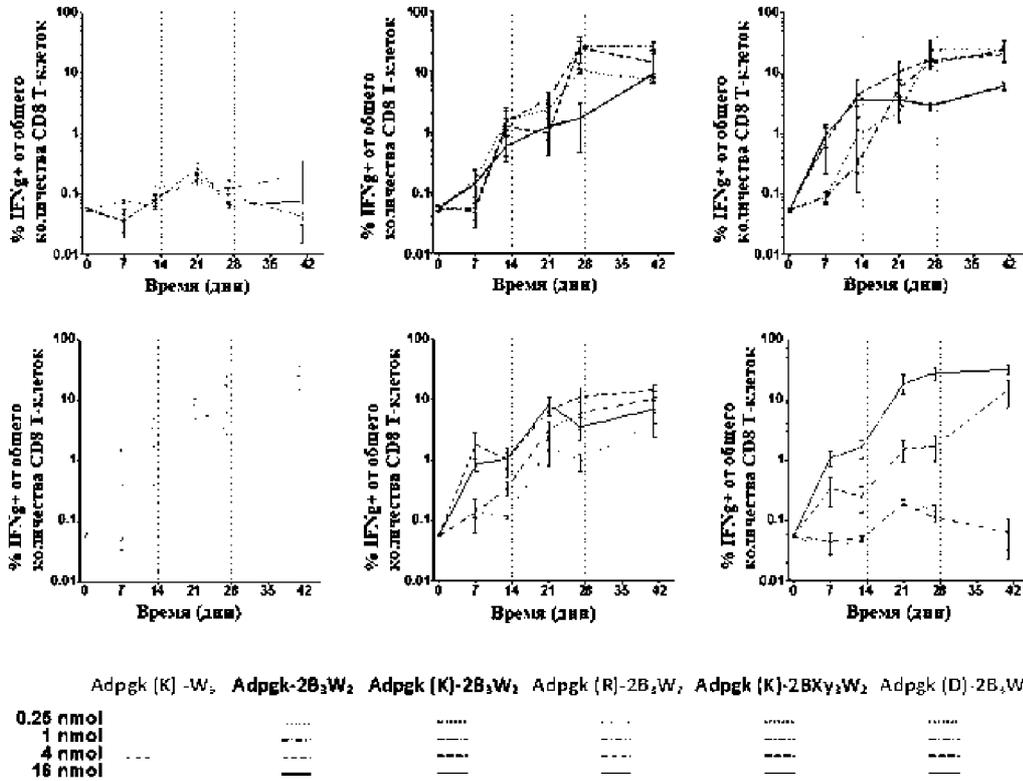


Фиг. 20



Фиг. 21

Вакцина	Последовательность (Δ-B2-(L)-H или C-B1-Δ-B2-(L)-H)
Adpgk (K) -W ₁	KKK-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCQ)-W5
Adpgk-2B ₃ W ₂	ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCQ)-2B3W2
Adpgk (K)-2B ₃ W ₂	KKK-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCQ)-2B3W2
Adpgk (R)-2B ₃ W ₂	RRR-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCQ)-2B3W2
Adpgk (K)-2BX ₃ W ₂	KKK-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCQ)-2BX ₃ W2
Adpgk (D)-2B ₃ W ₂	Ac-DDDDDDDD-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCQ)-2B3W2



Фиг. 22

Изменяющаяся заряженная молекула

A

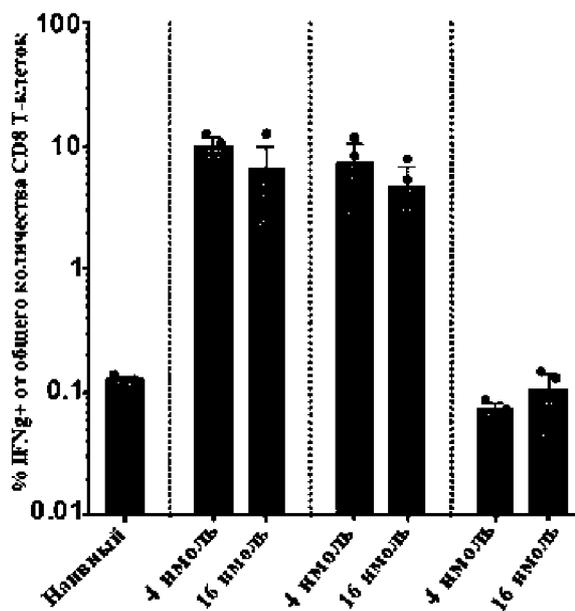


Заряд молекулы	Последовательность (C-B1-A-B2-(L)-H)
Положительный	KKKK-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DBCO)-2B3W2
Отрицательный	Ac-DDDDDDDDDDDDDD-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFFI-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Нейтральный	HO-PEG24-ASMTNMELM-GSPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензодивалкоксим; Ac = N-концевой ацетил

B

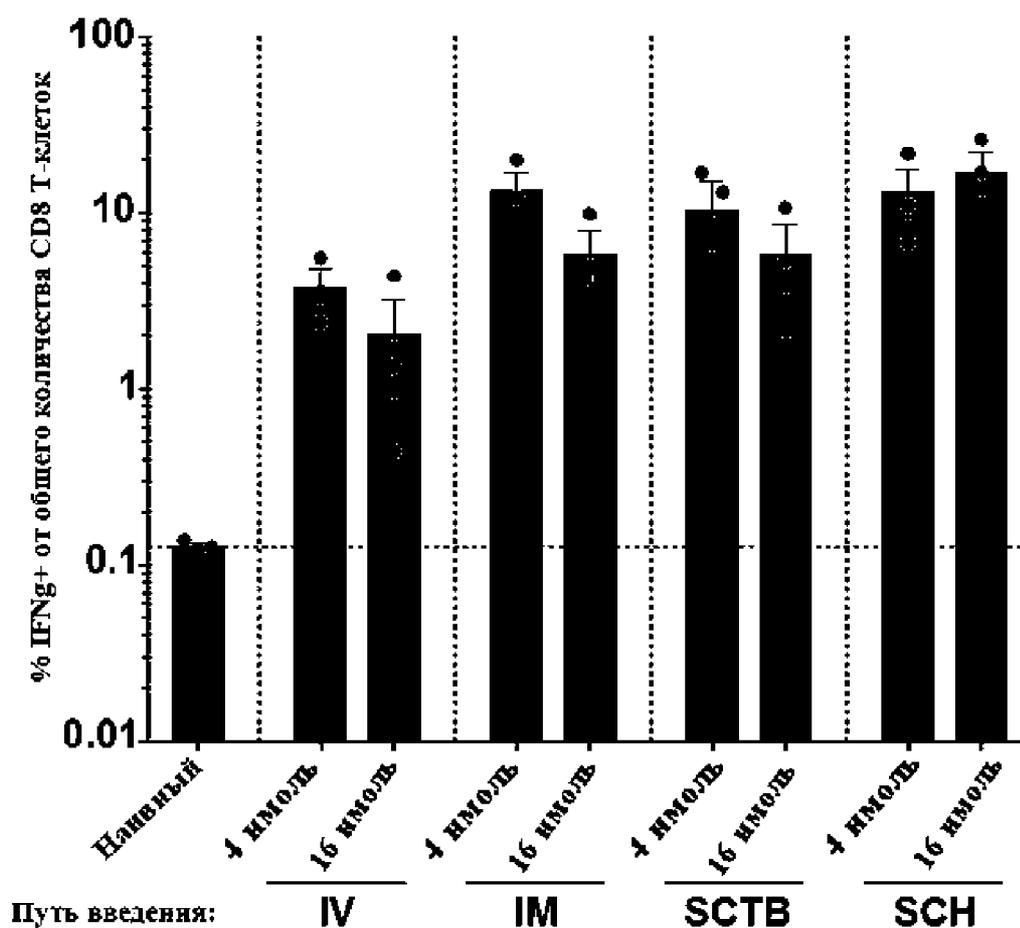
Влияние композиции с C-блоком на CD8 T-клеточные ответы (d36)



С-блок: Положительный Отрицательный PEG

Фиг. 23

Влияние пути введения на CD8 T-клеточные ответы (d36)
с применением SNP-7/8a с положительным С блоком (поли(К))



Заряд молекулы	Последовательность (С-В1-Δ-В2-(L)-Н)
Положительный	KKKK-SLVR-ASMTNMELM-SLVR-(K'-DVCQ)-2V3W2

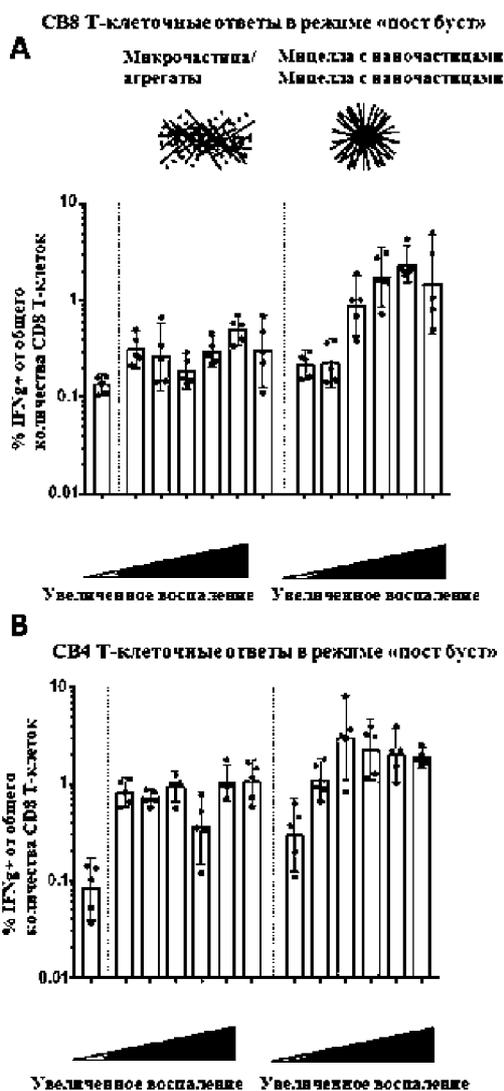
K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DVCQ = дибензоциклооктенин

Фиг. 24

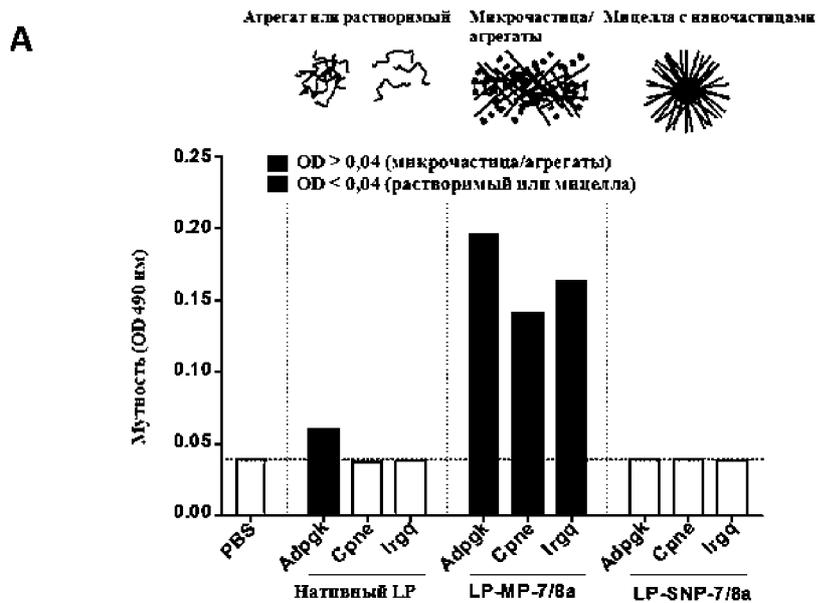
Композиции вакцин на основе Adp/gk

Последовательность (C-B1-A-B2-(L)-H)	Частица
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2BXy5	MP
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B2W8	MP
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	MP
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B3	MP
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B2	MP
<u>EK-SLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B1	MP
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2BXy5	NP
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B2W8	NP
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B5	NP
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B3	NP
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B2	NP
<u>KSKS-KLVR-ASMTNMELM-SSGGELVR</u> -(K'-DBCO)-2B1	NP

MP = микрочастица; NP = наночастица; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензодиклоктин



Фиг. 25

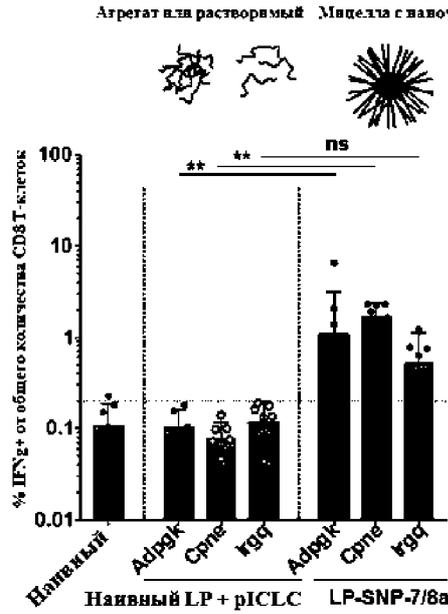


Вакцина	Последовательность (Δ или Δ(L)-Н или C-B1-Δ-B2-(L)-Н)
Нативный LP Adpgk	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT
Нативный LP Cpne1	DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY
Нативный LP Irgq	KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD
Adpgk LP-MP-7/8	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 LP-MP-7/8	DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgq LP-MP-7/8	KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-(K'-DBCO)-2B3W2
Adpgk LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 LP-SNP-7/8a	KKKKKKKKK-VR-DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgq LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

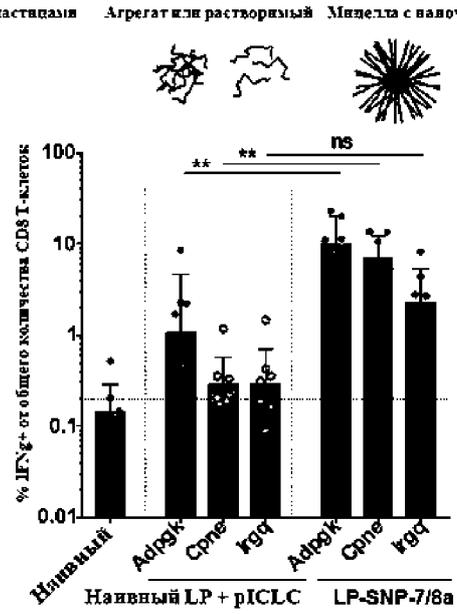
Z = пептидный; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензопиноктин

Фиг. 27

B



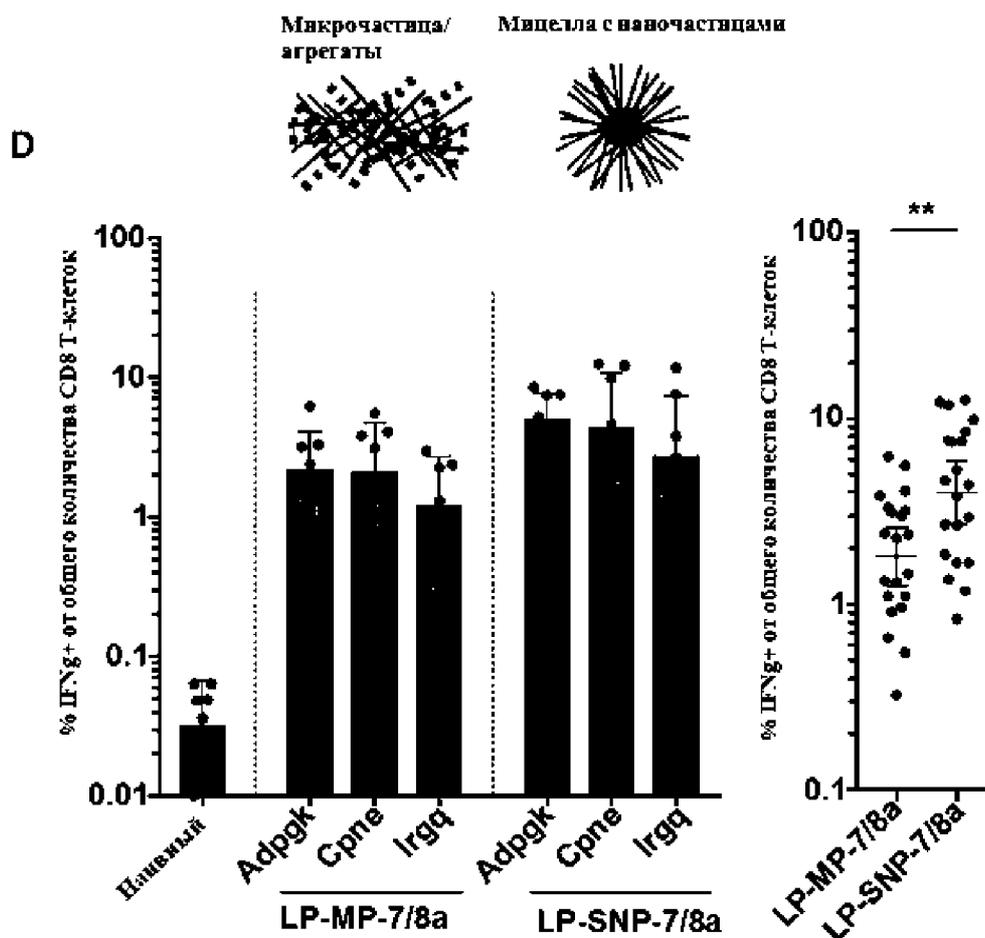
C



Вакцина	Последовательность (A или A(L)-H или C-B1-A-B2-(L)-H)
Наивный LP Adpgk	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHOQVFPT
Наивный LP Српе1	DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY
Наивный LP Iggq	KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD
Adpgk LP-MP-7/8	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHOQVFPT-(K'-DBCO)-2B3W2
Српе1 LP-MP-7/8	DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-(K'-DBCO)-2B3W2
Iggq LP-W7/8	KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-(K'-DBCO)-2B3W2
Adpgk LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHOQVFPT-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Српе1 LP-SNP-7/8a	KKKKKKKKK-VR-DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Iggq LP-SNP-7/8a	KKKKKKKKK-VR-KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = пептуллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктенин

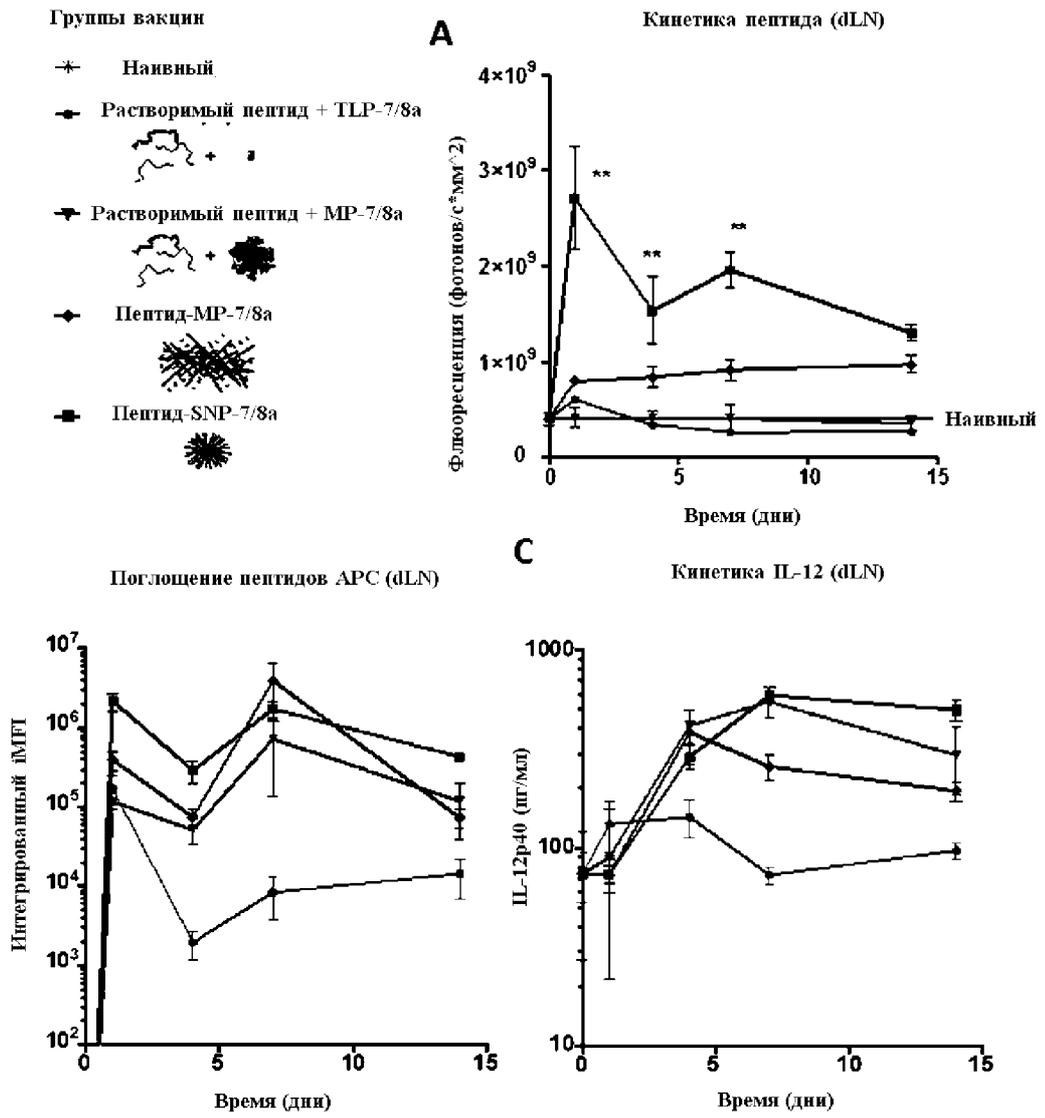
Фиг. 27 продолжение



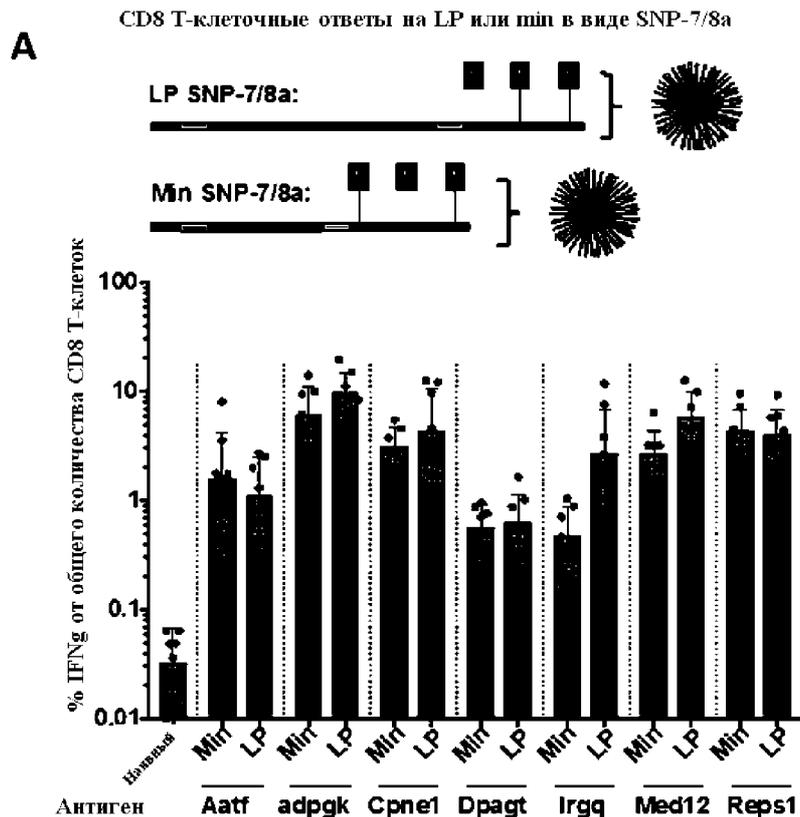
Вакцина	Последовательность (A(L)-H или C-B1-A-B2(L)-R)
Adpgk LP-MP-7/8	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 LP-MP-7/8	DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgg LP-MP-7/8	KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-(K'-DBCO)-2B3W2
Adpgk LP-SNP-7/8a	<u>KKKKKKK-VR</u> -GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 LP-SNP-7/8a	<u>KKKKKKKKK-VR</u> -DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgg LP-SNP-7/8a	<u>KKKKKKK-VR</u> -KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = пептид-липид; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензотриазолокарбион

Фиг. 27 продолжение



Фиг. 28

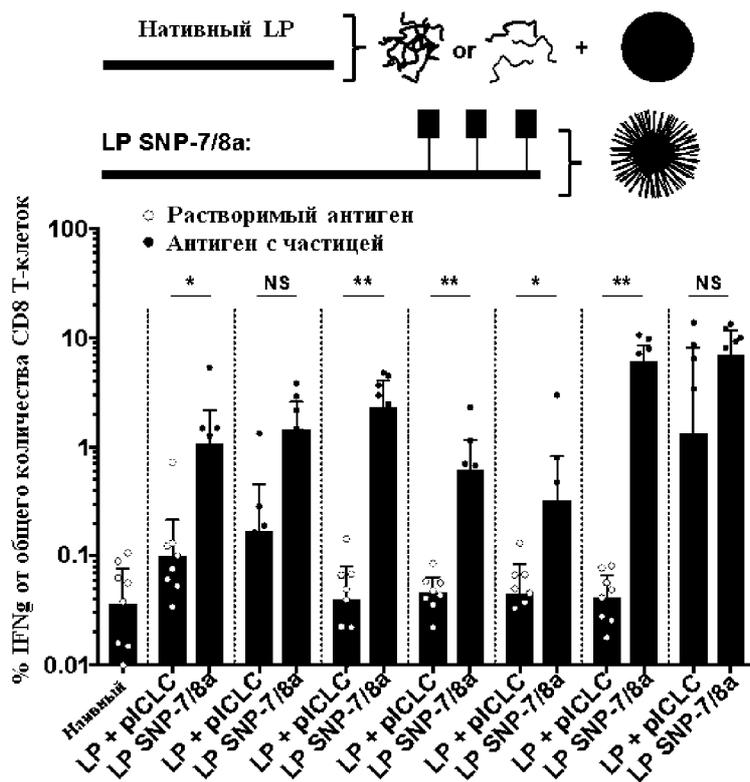


Вакцина	Последовательность (C-B1-A-B2-(L)-H)
Aatf Min-SNP-7/8a	KKKK-SLVR-MAPIDHTM-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Adpgk Min-SNP-7/8a	KKKKK-SLVR-ASMTNMELM-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 Min-SNP-7/8a	KKKK-SLVR-SSPYSLHYL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Dpagt Min-SNP-7/8a	KKKK-SLVR-SIIVFNLL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgq Min-SNP-7/8a	KKKK-SLVR-AALLNSAVL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Med12 Min-SNP-7/8a	KKK-SLVR-SSVLFEYM-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Repl1 Min-SNP-7/8a	KKKKK-SLVR-AQLANDVVL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Aatf LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-SKLLSFMAPIDHTTMSDDARTELFPS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Adpgk LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 LP-SNP-7/8a	KKKKKKKKK-VR-DFTGSGNDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Dpagt LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-EAGQSLVISASIIVFNLELEGDYR-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgq LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-KARDETAALLNSAVLGAAPLFPVPPAD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Med12 LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Repl1 LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

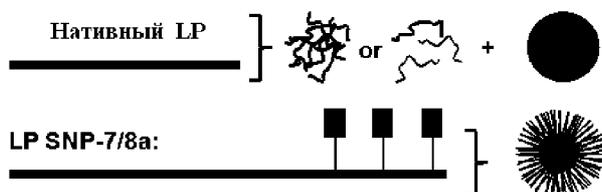
Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктин

Фиг. 29

CD8 Т-клеточные ответы на LP + pICLC или LP в виде SNP-7/8a



Антиген : Aatf adpgk Cpne1 Dpagt Irgq Med12 Reps1
CD8 T cell responses to LP + pICLC or LP as SNP-7/8a



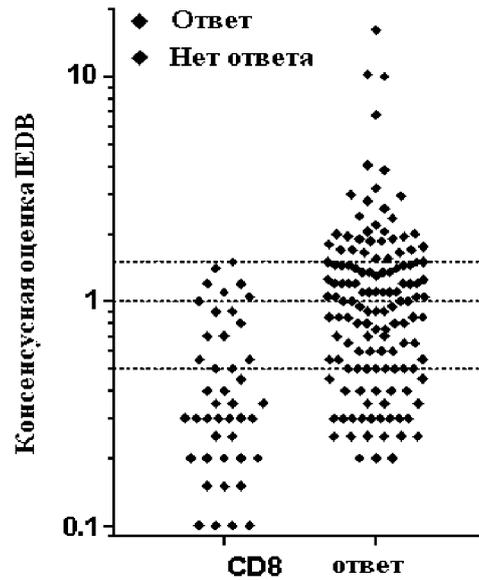
Вакцина	Последовательность (A или C-B1-A-B2-(L)-H)
Нативный LP Aatf	SKLLSFMAPIDHTTMSDDARTELFRS
Нативный LP Adpgk	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT
Нативный LP Cpne1	DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY
Нативный LP Dpagt	EAGQSLVISASIVFNLELEGDYR
Нативный LP Irgq	KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD
Нативный LP Med12	DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP
Нативный LP Reps1	GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR
Aatf LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-SKLLSFMAPIDHTTMSDDARTELFRS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Adpgk LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Cpne1 LP-SNP-7/8a	KKKKKKKKK-VR-DFTGSNGDPSSPYSLHYLSPTGVNEY-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Dpagt LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-EAGQSLVISASIVFNLELEGDYR-GSGVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Irgq LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-KARDETAALLNSAVLGAAPLFVPPAD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Med12 LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Reps1 LP-SNP-7/8a	KKKKKKK-VR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктенин

Фиг. 30

A

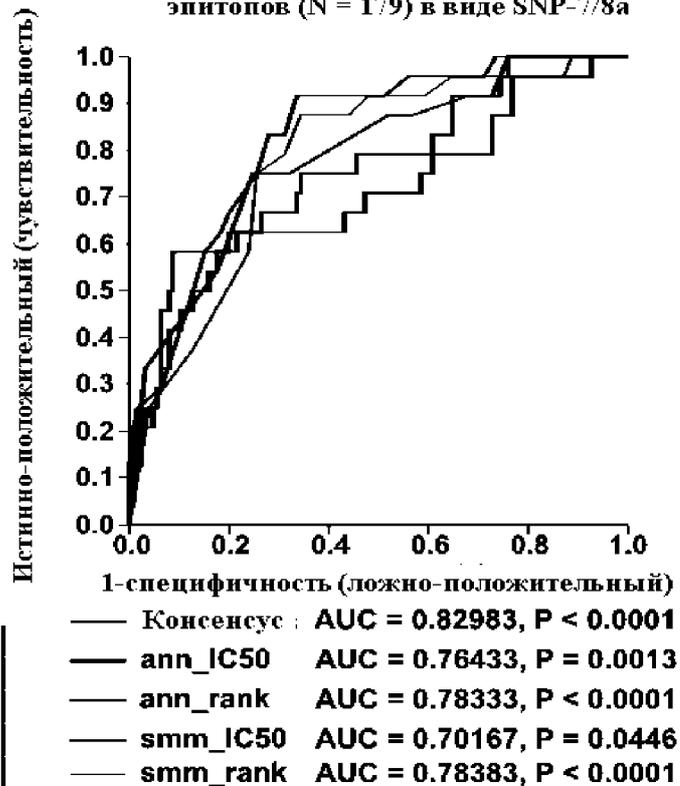
Иммуногенность CD8 Т-клеточных эпитопов (N = 179) в виде SNP-7/8a



Консенсусная оценка IEDB	Да	Нет	%
$x \leq 0,5$	27	28	49,1
$0,5 < x < 1,0$	9	37	19,6
$1,0 < x < 1,5$	7	35	16,7
$1,5 \leq x$	0	36	0,0

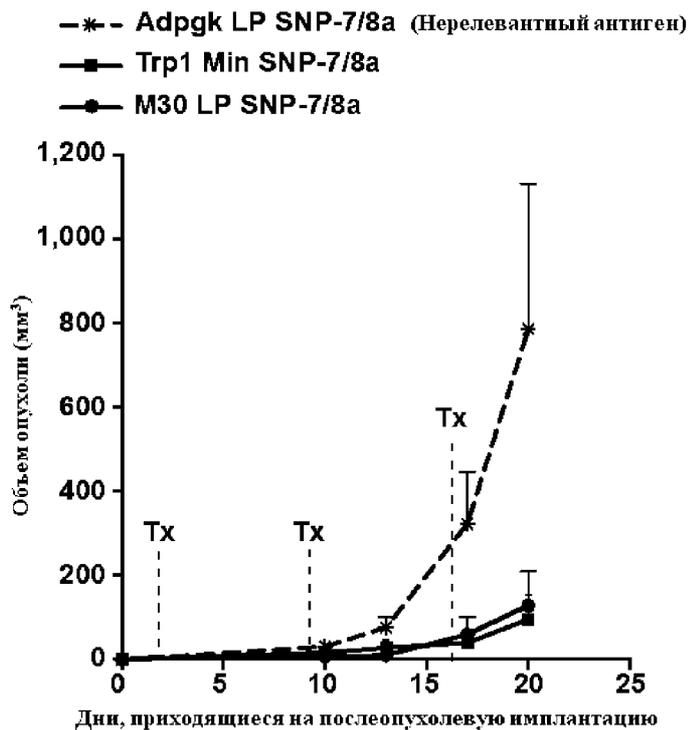
B

Иммуногенность CD8 Т-клеточных эпитопов (N = 179) в виде SNP-7/8a



Фиг. 31

Лечение развившейся опухоли В16.F10

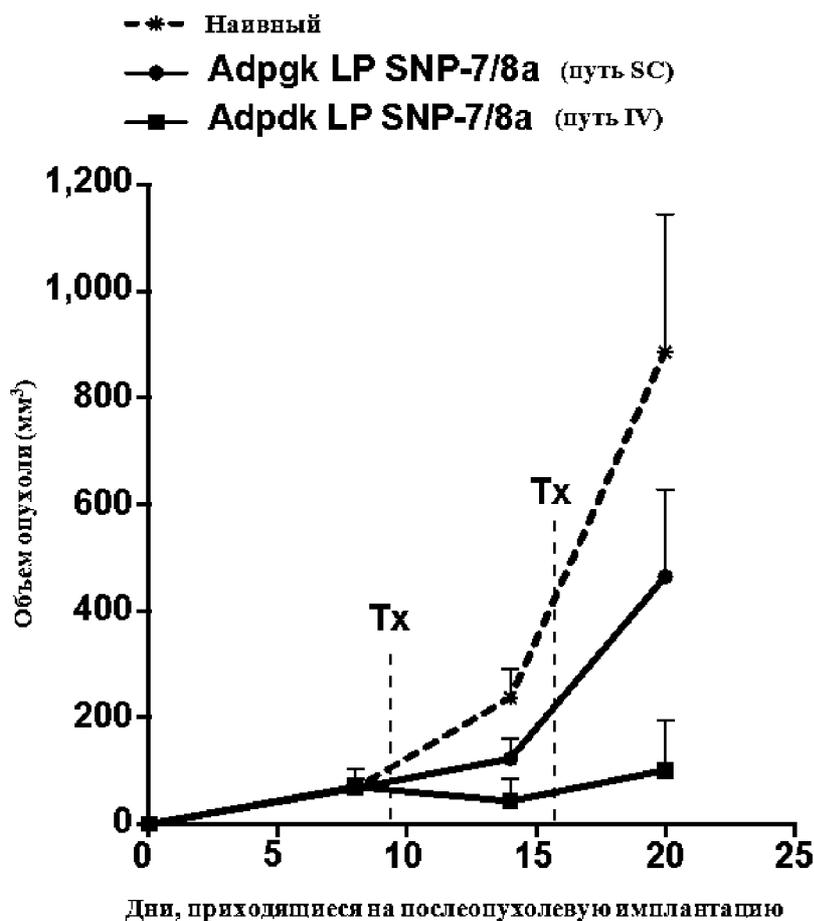


Вакцина	Последовательность (C-B1-A-B2-(L)-H)
Med12 LP-NP-7/8a	KKKKKKKKKKK-VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
M30 LP-NP-7/8a	KKKKKKKKKKK-VR-PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Trp1 LP-NP-7/8a	KK-PLR-TAPDNLGYM-SLVR-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктин

Фиг. 32

Лечение развившейся опухоли МС38

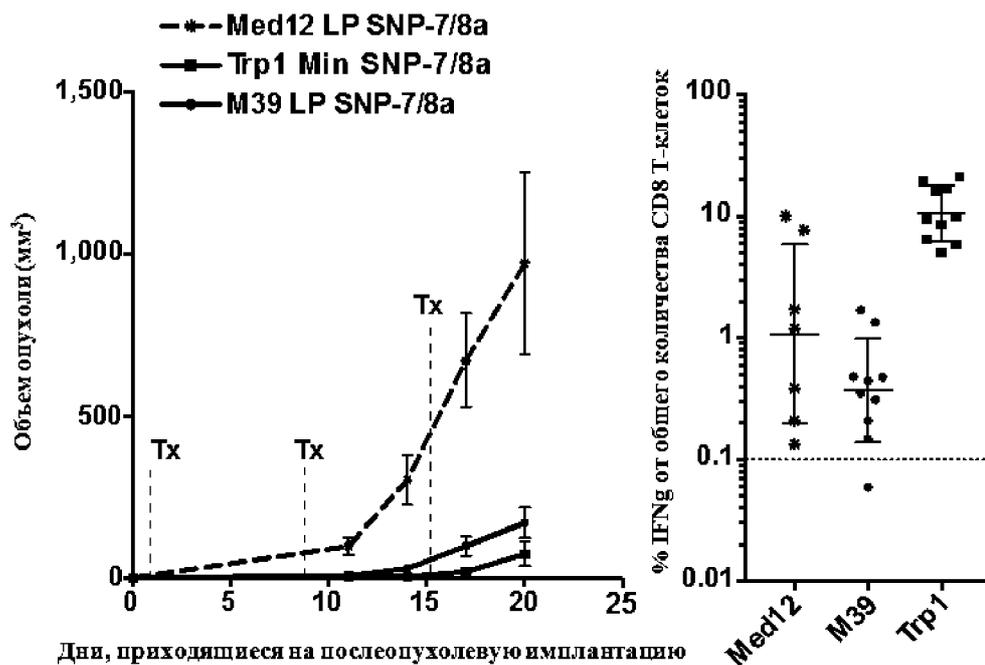


Вакцина	Последовательность (<u>C</u> -B1- <u>A</u> -B2-(L)-H)
Med12 LP-SNP-7/8a	<u>KKKKKKKKKK</u> -VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Trp1 LP-SNP-7/8a	<u>KK-PLR-TAPDNLGYM-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B3W2
M39 LP-SNP-7/8a	<u>KK-VR-ELINFKRKRVA</u> AFQKNLIEMSELEIKHG-SL VZ-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = пептидин; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктин

Фиг. 33

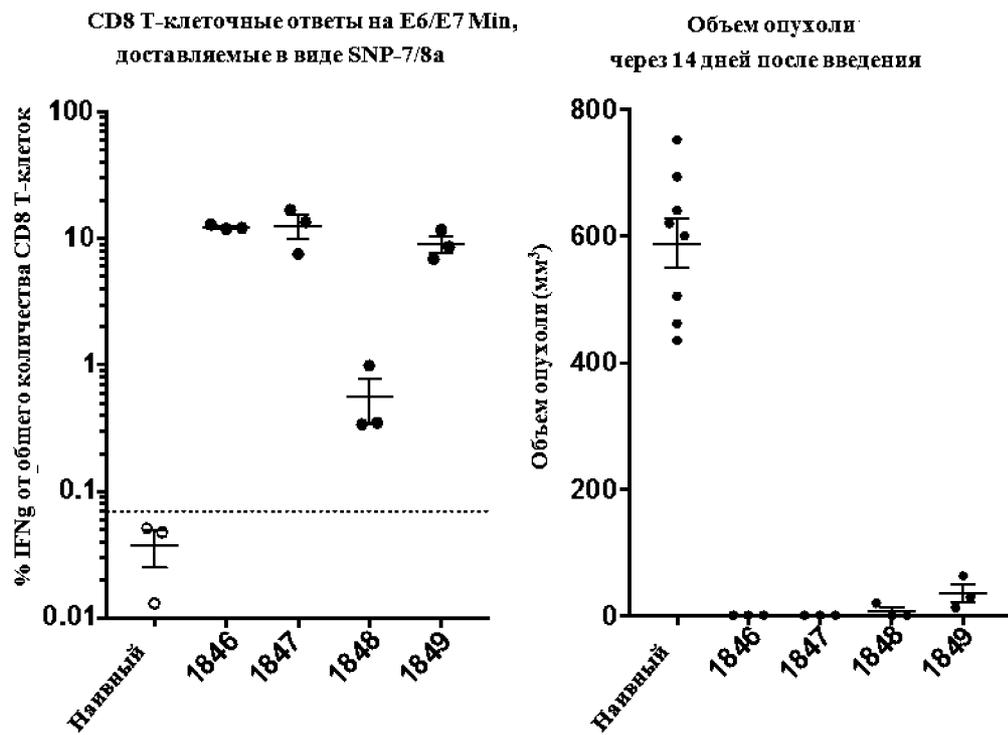
Лечение развившейся опухоли В16.F10



Вакцина	Последовательность (<u>C</u> - <u>B1</u> - <u>A</u> - <u>B2</u> -(L)-H)
Med12 LP-SNP-7/8a	<u>KKKKKKKKKK</u> -VR-DIDPSSSVLFEYMEKPDFSLFSP-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
Trp1 LP-SNP-7/8a	<u>KK-PLR-TAPDNLGYM-SLVR</u> -(K'-DBCO)-2B3W2
M39 LP-SNP-7/8a	<u>KK-VR-ELINFKRKRVAAFQKNLIEMSELEIKHG-SLVZ</u> -(K'-DBCO)-2B3W2

Z = пептид; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктат

Фиг. 34



Вакцина	Последовательность (<u>C</u> - <u>A</u> -B2-(L)-H или <u>C</u> -B1- <u>A</u> -B2-(L)-H)
1846	KKK-SLVR-RAHYNIVTF-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
1847	KKK-RRAHYNIVTF-Z-(K'-DBCO)-2B3W2
1848	KKKKK-VR-CKQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDG-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2
1849	KKKKKK-SLVR-EVYDFAFRDL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2

Z = пептидин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензопяклоктин

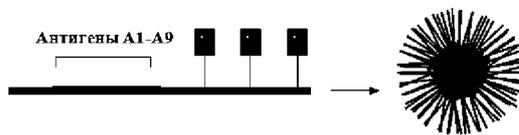
Фиг. 35

LP-антигены A1-A9

A

Антиген	Пептидная последовательность	Длина	Заряд	Грауэ
A1	ETLGEISFLLSLDLHFTDGDYSAGD	25		0.016
A2	DDEGDYTCQFTHVENGTNYIVTATR	25		-0.904
A3	GIPVHLELASMTNMLMSSIVHQQVFPT	28	-2	0.429
A4	VVDRNPQFLDPVLAFLMKGLCEKPLAS	27	0	0.196
A5	NEGIDKLTQLKPKPLVNNKINKIENI	27	2	-0.474
A6	MAAALTFRRLLTPRAARGFGVQVS	25		0.560
A7	GRGHLLGRLLAIVGKQVLLGRKVVVVR	27		0.859
A8	QGTDVVIAIFILAMSFVPASFVVF	25	-1	2.000
A9	LKSSPERNDWEPLDKKVDTRKYRAE	25	1	-1.908

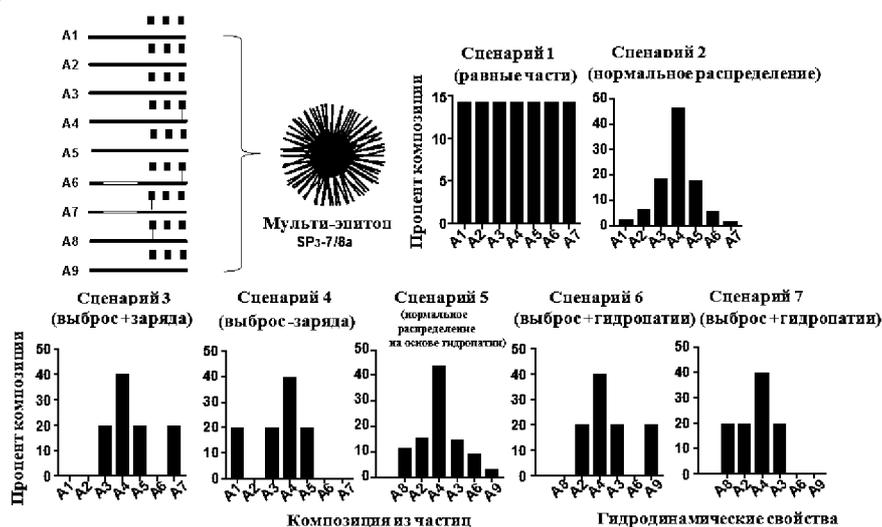
B



Антигенный конъюгат	Последовательность (B1-A-B2-(L)-H или C-B1-A-B2-(L)-H)	Суммарный заряд	Размер частиц (диаметр, нм)	Мутность (OD 490 нм)
A1-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-ETLGEISFLLSLDLHFTDGDYSAGD-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	17,2	0,04
A2-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-DDEGDYTCQFTHVENGTNYIVTATR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	25,6	0,04
A3-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMLMSSIVHQQVFPT-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	22,2	0,04
A4-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-VVDRNPQFLDPVLAFLMKGLCEKPLAS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	17,0	0,04
A5-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-NEGIDKLTQLKPKPLVNNKINKIENI-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	26,4	0,04
A6-2B ₃ W ₂	KK-VR-MAAALTFRRLLTPRAARGFGVQVS-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	23,6	0,04
A7-2B ₃ W ₂	VR-GRGHLLGRLLAIVGKQVLLGRKVVVVR-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	8	43,4	0,04
A8-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-QGTDVVIAIFILAMSFVPASFVVF-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	9	173,0	0,05
A9-2B ₃ W ₂	KKKKKKKKKKKK-VR-LKSSPERNDWEPLDKKVDTRKYRAE-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	7	22,8	0,04

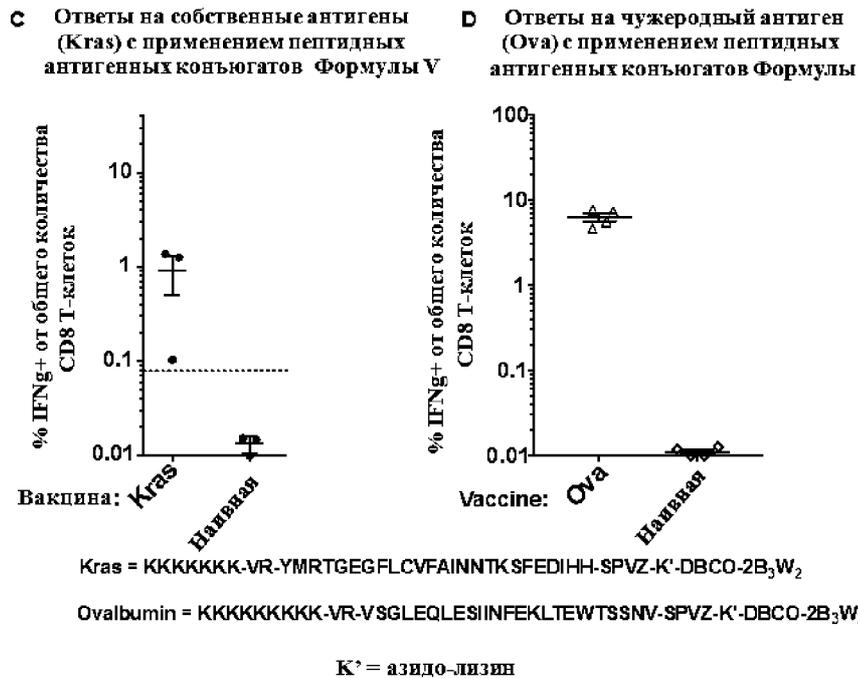
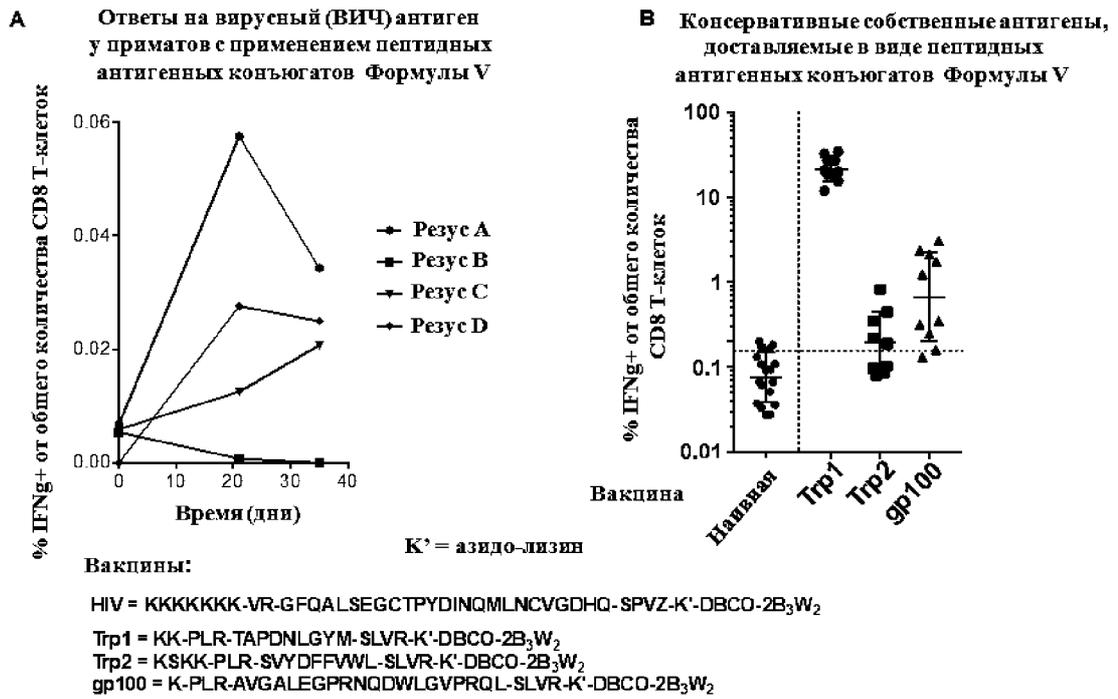
Z = дитирулян; K' = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензопиклоктин

C

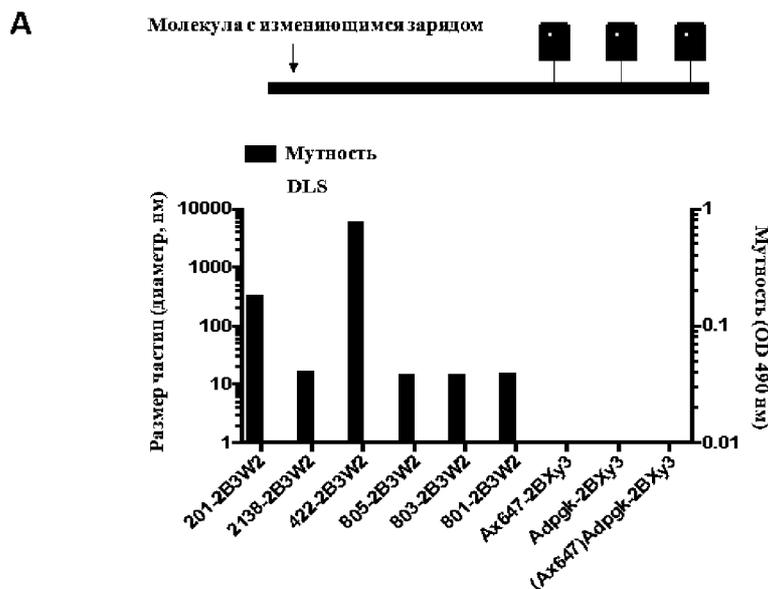


Сценарий	Композиция из частей									Мутность (OD 490 нм)	Размер частиц (нм)
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9		
1	12.5%	12.5%	12.5%	12.5%	12.5%	12.5%	12.5%	0.0%	0.0%	0.04	29.1
2	2.6%	6.6%	18.6%	46.5%	17.9%	5.9%	1.9%	0.0%	0.0%	0.04	42.0
3	0.0%	0.0%	20.0%	40.0%	20.0%	0.0%	20.0%	0.0%	0.0%	0.04	29.2
4	20.0%	0.0%	20.0%	40.0%	20.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.04	43.1
5	0.0%	16.0%	15.0%	44.0%	0.0%	9.0%	0.0%	11.0%	3.4%	0.04	23.0
6	0.0%	20.0%	20.0%	40.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	20.0%	0.04	17.2
7	0.0%	20.0%	20.0%	40.0%	0.0%	0.0%	0.0%	20.0%	0.0%	0.04	26.0

Фиг. 36
48



Фиг. 37

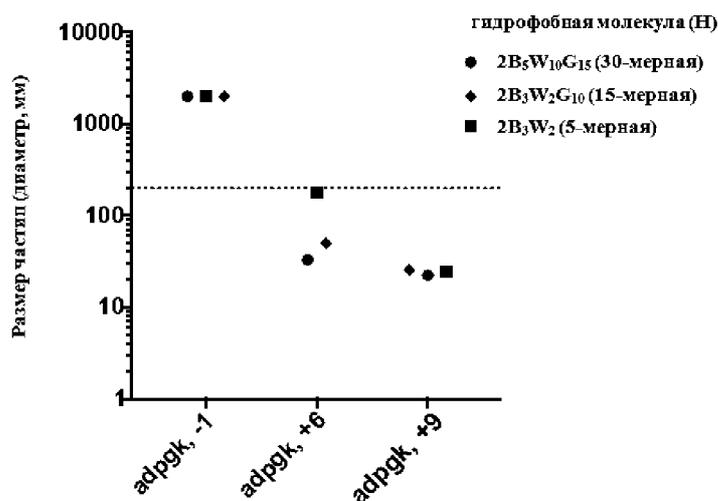


Антигенный конъюгат	Последовательность (B1-A-B2-(L)-H или C-B1-A-B2-(L)-H)	Суммарный заряд
201-2B ₃ W ₂	AQLANDVVL-QSLVR-(K'-DBCO)-2B3W2	1
2138-2B ₃ W ₂	K*K*K*K*-VR-AQLANDVVL-SPVZ-(K'-DBCO)-2B3W2	5
422-2B ₃ W ₂	SPERNWWEPL-SLVR-(K'-DBCO)-2B3W2	-1
805-2B ₃ W ₂	Ac-S'-SPLZ-SPERNWWEPL-GGSPLZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-4
803-2B ₃ W ₂	Ac-S'S'-PLZ-SPERNWWEPL-GGSPLZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-6
801-2B ₃ W ₂	Ac-S'S'S'-PLZ-SPERNWWEPL-GGSPLZ-(K'-DBCO)-2B3W2	-8
Ax647-2BXy ₃	Ax647-(K'-DBCO)-2BXy3	-3
Adpgk-2BXy ₃	ASMTNMELMS-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3	1
(Ax647)Adpgk-2BXy ₃	Ax647-ASMTNMELMS-SLVR-(K'-DBCO)-2BXy3	-3

Ac = N-концевой ацетил; Z = пептулин;
 K* = азидо-Лизин (Lys(N3)); DBCO = дибензоциклооктин;
 S' = фосфосерин; K* = (6-N, 6-N, 6-N)триметиллизин
 Ax647 = Alexa Fluor® 647

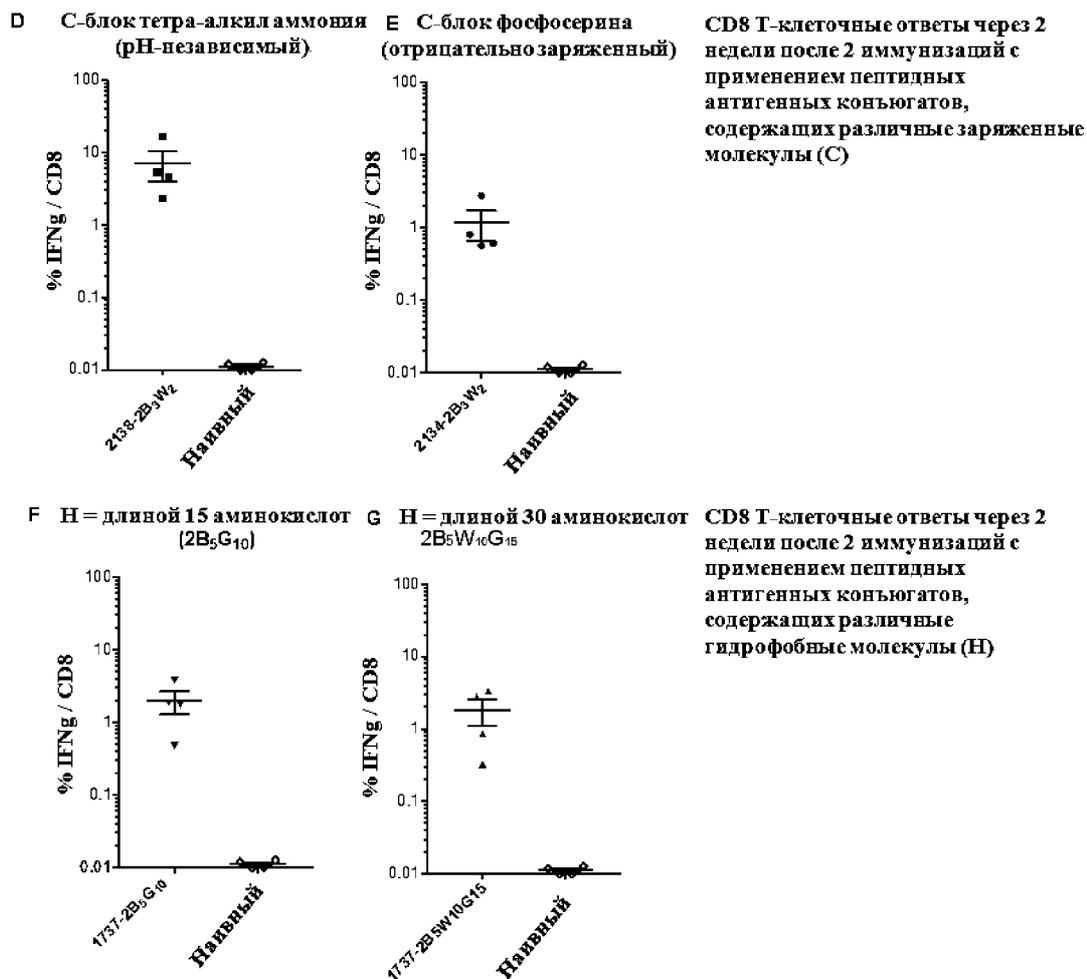
B

Пептидные антигенные конъюгаты Формулы V, сцепленные с различными гидрофобными молекулами Формулы II, сцепленные с адьювантами Формулы III



Adpgk, -1: GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPTGSPVZK'-DBCO-H
 Adpgk, +6: KKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPTG-SGVZK'DBCO-H
 Adpgk, +9: KKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSIVHQQVFPT-SPVZK'DBCO-H

Фиг. 38



2138-2B₃W₂ = K+K+K+K+-VR-AQLANDVVL-SPVZ-K'-DBCO-2B₃W₂

при этом, K+ = представляет собой аминокислоту, модифицированную тетра-алкил аммонием;

при этом, S' представляет собой фосфосерин;

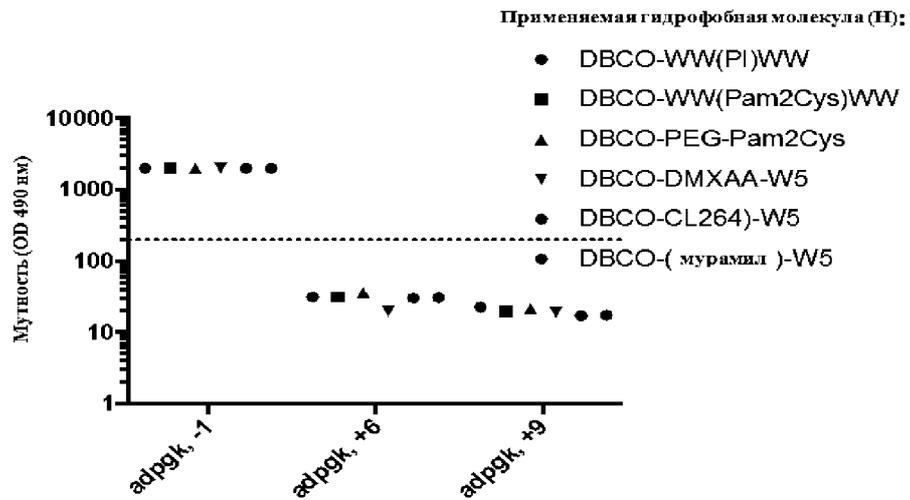
при этом, 2B₅G₁₀ = E(2B)GGE(2B)GGE(2B)GGE(2B)GGE(2B)GG;

при этом, 2B₅W₁₀G₁₅ = K(2B)GWCWGK(2B)GWCWGK(2B)GWCWGK(2B)GWCWGK(2B)GWCWG;

K' = азидо-лизин

Фиг. 38 продолжение

**Зависимость размера частиц от суммарного заряда
пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные Н**

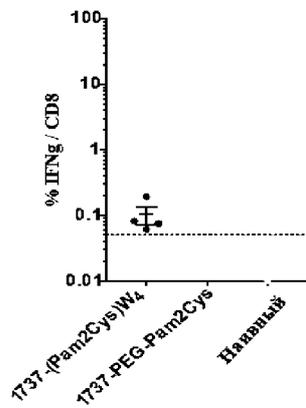


Антиген	Последовательность (A-X1 или C-B1-A-B2-X1)	Суммарный заряд
Adpgk, -1	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-K'	-1
Adpgk, +6	KKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-GSGVZ-K'	6
Adpgk, +9	KKKKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-SPVZ-K'	9

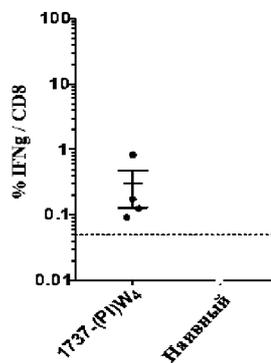
Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); Ac = N-концевой ацетил

CD8 Т-клеточные ответы через 2 недели после 2 иммунизаций с применением пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные агонисты PRR

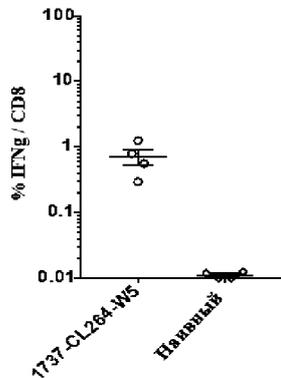
A Агонист TLR-2, несущий Н



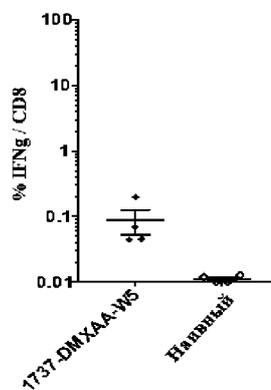
B Н, спеленный с агонистом TLR-4



C Н, спеленный с агонистом TLR-7



D Н, спеленный с агонистом STING

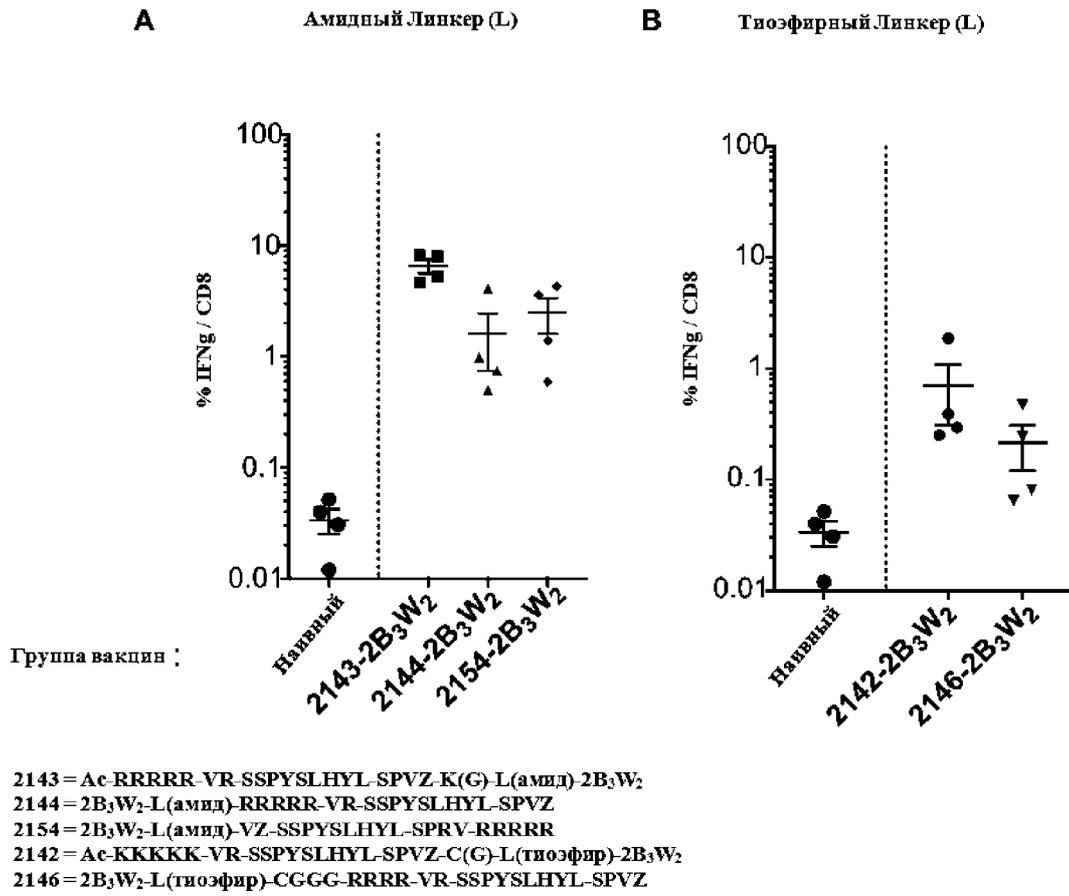


1737 = KKKKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-SPVZ-K'

Где K' = азидо-лизин

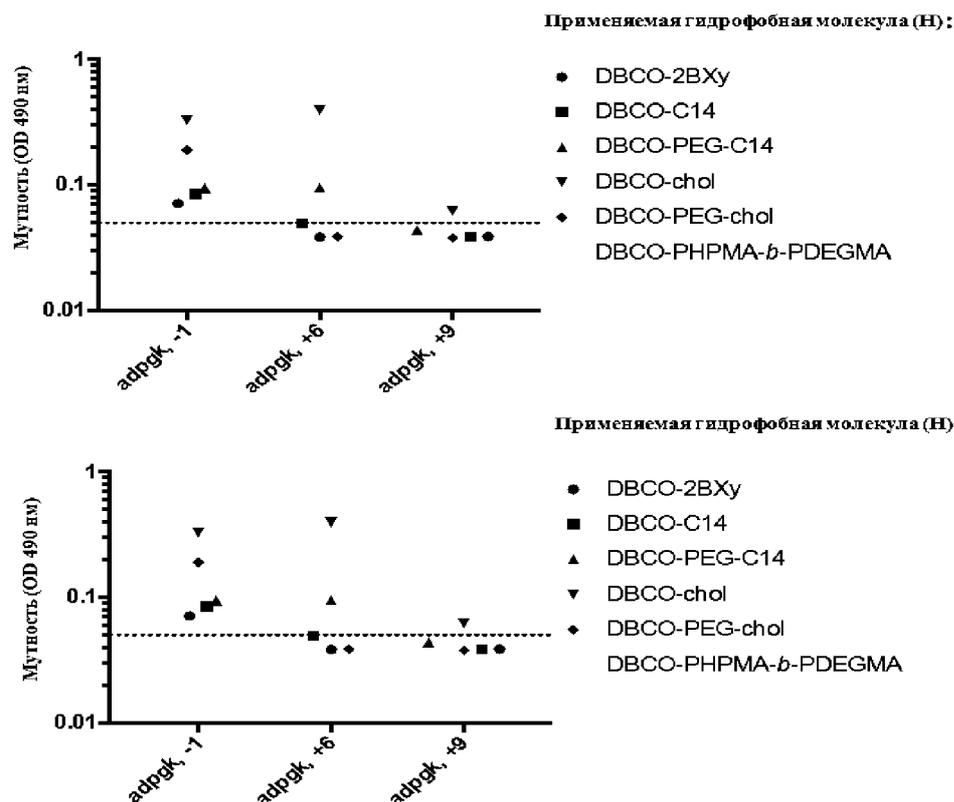
Фиг. 39

CD8 T-клеточные ответы через 2 недели после 2 иммунизаций с применением пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные Линкеры (L)



Фиг. 40

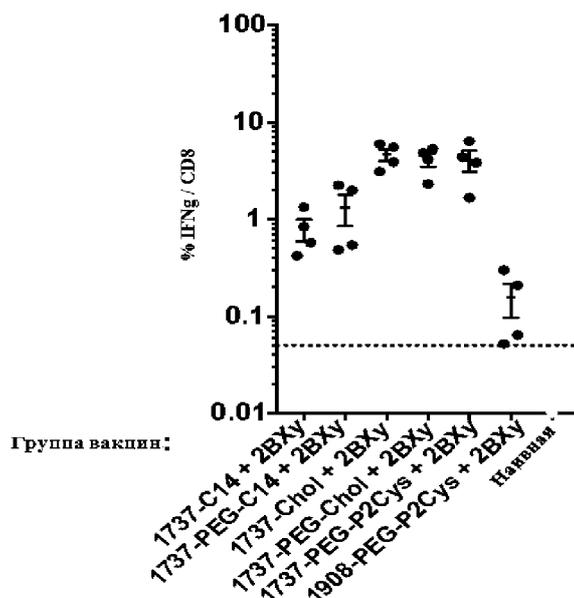
**Зависимость размера частиц от суммарного заряда
пептидных антигенных конъюгатов, содержащих различные Н**



Антиген	Последовательность (A-X1 или C-B1-A-B2-X1)	Суммарный заряд
Adpgk, -1	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT-K'	-1
Adpgk, +6	KKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT-GSGVZ-K'	6
Adpgk, +9	KKKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT-SPVZ-K'	9

Z = пептидин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); Ac = N-концевой ацетил

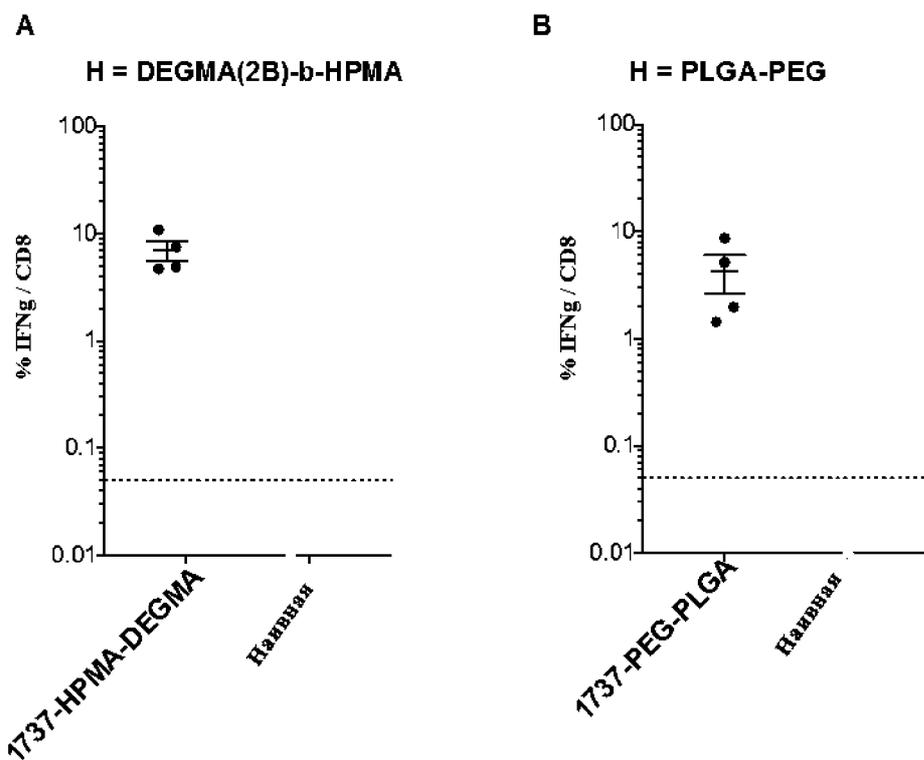
CD8 Т-клеточные ответы через 2 недели после 2 иммунизаций с применением пептидных антигенных конъюгатов, при этом, Н = Жирная кислота (C14), холестерин или липид



1737 = KKKKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT-SPVZ-K'-DBCO-H
 1908 = KKK-VR-MAAALTFRRLLTLPRRAARGFGVQVS-SPVZ-K'-DBCO-H
 Где K' = азидо-лизин

Фиг. 41

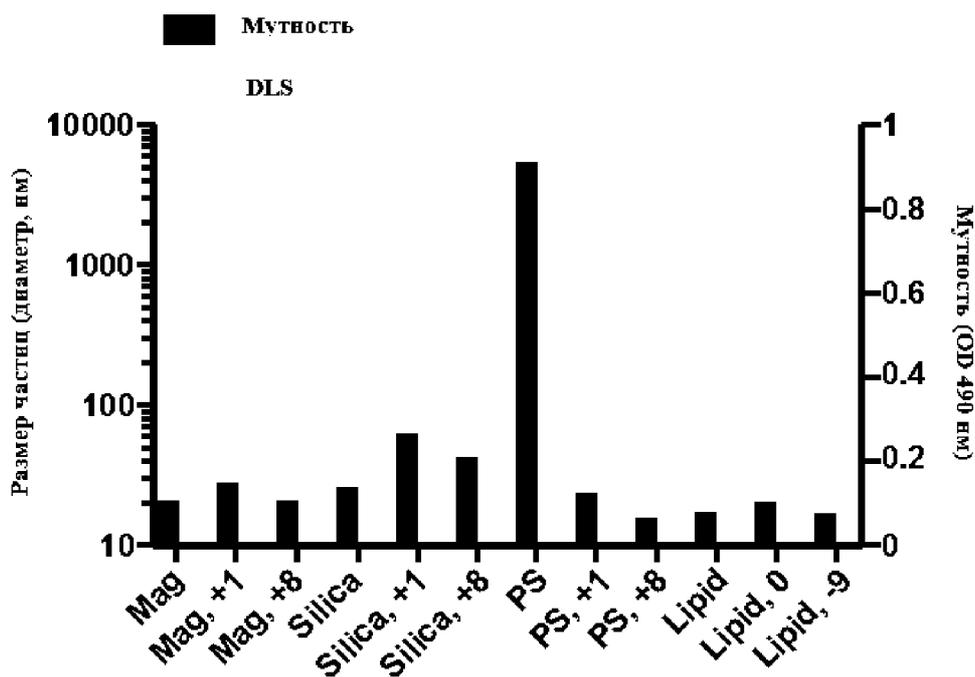
CD8 T-клеточные ответы через 2 недели после 2 иммунизаций с применением пептидных антигенных конъюгатов, при этом, H = диблок-сополимер типа А-В



1737 = KKKKKKKKKK-VR-GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQVFPT-SPVZ-K'-DBCO-H

Фиг. 42

Размер частиц и стабильность пептидных антигенных конъюгатов, содержащих предварительно образованные Частицы (P)



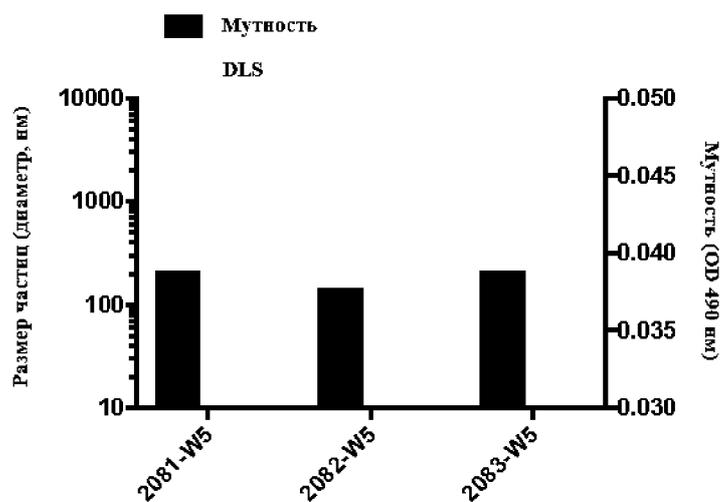
Антиген	Последовательность (A-X1 или A-B2-X1 или C-B1-A-B2-X1)	Суммарный заряд
214	GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-K'	1
1588	KKKKKK-IR-GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR-SPVZ-K'	8
1016	ASMTNMELM-GSPVZ-K'	0
1197	Ac-DDDDDDDD-SPVZ-ASMTNMELM-SPVZ-K'	-9

Z = цитруллин; K' = азидо-Лизин (Lys(N3)); Ac = N-концевой ацетил

Магний = DBCO-функционализированные наночастицы оксида железа (~ 20 нм),
 Двоксид кремния = DBCO-функционализированные наночастицы диоксида кремния (~ 20 нм),
 Полистирол = DBCO-функционализированные наночастицы полистирола (~ 20 нм),
 Липид = DBCO-функционализированные липосомы (~ 200 нм).

Фиг. 43

Аутоантигены, доставляемые в виде пептидных антигенных конъюгатов Формулы V, скапливаются в стабильные наночастицы

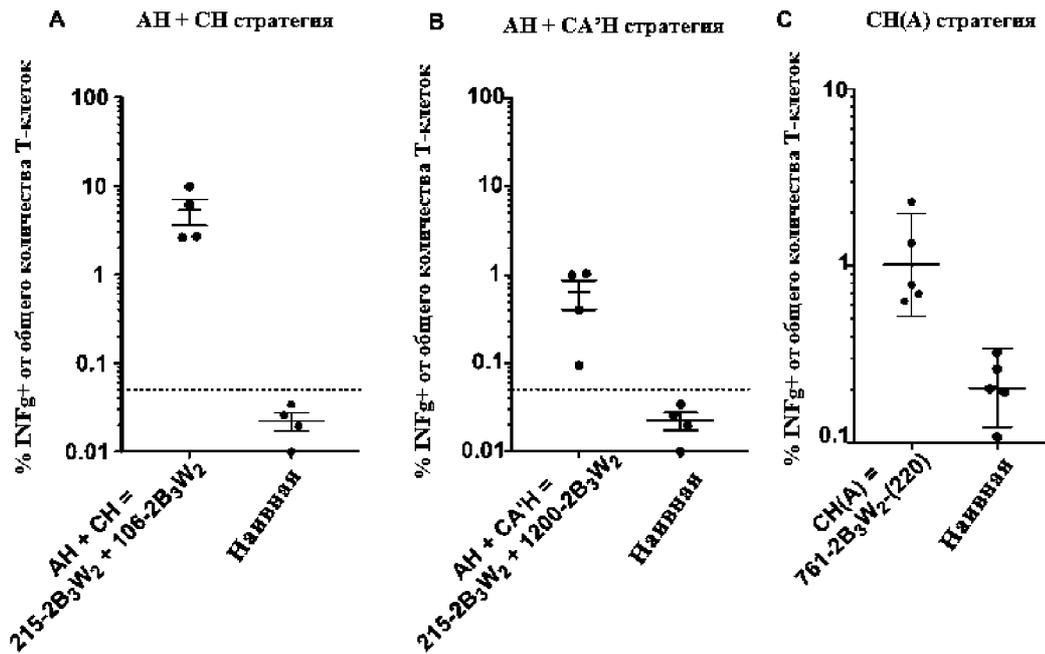


Антигенный конъюгат	Последовательность (C-B1-A-B2-(L)-H)	Размер частиц (диаметр, нм)	Мутность (OD 490 нм)
2081-W ₅	KKK- <i>FR</i> -MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-SPVZ-(K'-DBCO)-W5	14,0	0,04
2082-W ₅	KKKKKK- <i>FR</i> -GPLGPKGQAGEPGIAGFKGDQGPKEGTGPAGPQG-SPVZ-(K'-DBCO)-W5	14,4	0,04
2083-W ₅	KKKKKKK- <i>FR</i> -GEPGIAGFKGDQGPKEGTG-SPVZ-(K'-DBCO)-W5	15,0	0,04

Z = цитруллин; K^z = азидо-Лизин (Lys (N3)); DBCO = дибензоциклооктин

Фиг. 44

CD8 T-клеточные ответы через 2 недели после 2 иммунизаций



AH = 215-2B₃W₂ = GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-K'-DBCO-2B₃W₂

CA'H = 1200-2B₃W₂ = KKK-SLVR-AKFVAAWTLKAAA-SPVZ-K'-DBCO-2B₃W₂

AH = 215-2B₃W₂ = GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT-K'-DBCO-2B₃W₂

CH = 106-2B₃W₂ = KKKKKKKKKK-K'-DBCO-2B₃W₂

CH(A) = 761-2B₃W₂-(220) =

EEEE-2B₃W₂-(ASMTNMELM-SSLVR-K'-DBCO)

Фиг. 45