

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090030** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.08

(22) Дата подачи заявки
2018.06.21

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ АГЕНТОВ, ПЕРЕНАПРАВЛЯЮЩИХ ИММУННЫЕ ОТВЕТЫ

(31) 62/524,308; 62/676,566

(32) 2017.06.23; 2018.05.25

(33) US

(86) PCT/US2018/038701

(87) WO 2018/237115 2018.12.27

(88) 2019.01.31

(71) Заявитель:

ПАТОВАКС ЛЛК (US)

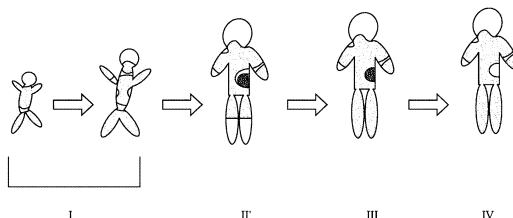
(72) Изобретатель:

**Ванг Джошуа Вэйюань, Ингават
Натта (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к химерным вирусоподобным частицам (VLP), собранным из полипептида, содержащего белок L1 или белок L1/L2 вируса папилломы (ВП), и целевой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, полученный из человеческого патогена. Настоящее изобретение также относится к способам применения химерных VLP в качестве антигенспецифичных агентов, перенаправляющих иммунные ответы.



A1

202090030

202090030

A1

ХИМЕРНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ АГЕНТОВ, ПЕРЕНАПРАВЛЯЮЩИХ ИММУННЫЕ ОТВЕТЫ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки № 62/676,566, поданной 25 мая 2018 г., и заявки № 62/524,308, поданной 23 июня 2017 г., полностью включенных в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к химерным вирусоподобным частицам (VLP), собранным из химерного полипептида, содержащего белок L1 или белок L1/L2 вируса папилломы (ВП), содержащего пептид(ы), содержащий(ие) CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, полученный(ые) из человеческого(их) патогена(ов), композициям, содержащим такие химерные VLP, и терапевтическому применению химерных VLP для перенаправления и стимуляции как врожденного, так и приобретенного иммунитета для лечения раковых заболеваний.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] По данным Национального института онкологии общий уровень смертности от рака продолжает снижаться: общие показатели заболеваемости раком снизились у мужчин и стабилизировались у женщин. Пятилетняя выживаемость также улучшилась для большинства, но не для всех распространенных раковых заболеваний. И тем не менее, согласно предварительным оценкам, в 2017 году только в США будет диагностировано 1 688 780 новых случаев заболевания раком и 600 920 случаев смерти от рака.

[0004] Цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты (часто называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами или ЦТЛ) могут избирательно уничтожать раковые клетки, и поэтому антигенспецифичная иммунотерапия на основе опухолеассоциированных антигенов рассматривается в качестве перспективного метода контроля опухолей. Были предприняты попытки применения такой иммунотерапии для стимуляции иммунной системы и специфичного нацеливания на опухолевые клетки и их устранения. Такие виды терапии привлекательны тем, что они специфичны к мишени и обладают потенциально меньшей токсичностью, не вызывая неспецифического аутоиммунитета. Они также считаются менее инвазивными или травматичными по сравнению с хирургическим вмешательством, радиационной терапией или химиотерапией. Однако противораковые вакцины на основе опухолеассоциированных антигенов до настоящего времени имели ограниченный успех из-за плохой клинической иммуногенности, иммунологической толерантности и плохих клинических результатов. При этом такие способы обычно

требуют идентификации опухолеассоциированного антигена для специфичного нацеливания на опухоль. Кроме того, растет понимание того, что микроокружение опухоли может содержать иммуносупрессивные факторы, например, белки контрольных точек (CP), например, PD-1/PD-L1, CTLA-4/(B7-1/B7-2), CD86, GITR, LAG3, VISTA, TIM3 и CD137L, которые могут ингибировать уничтожение Т-клетками раковых клеток. Белки CP могут нарушать индуктивную либо эффекторную фазу иммунного ответа, вызванного направленной антигенной иммунотерапией. Для преодоления этого угнетающего действия на иммунитет использовались ингибиторы иммунных контрольных точек с целью блокирования белков CP и восстановления подавленных Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам, в микроокружении опухоли, улучшая их способность уничтожать раковые клетки. Частота положительного ответа на лечение ингибиторами иммунных контрольных точек, хотя и является беспрецедентной, составляет в лучшем случае около 30%, поскольку для их эффективного действия требуется наличие специфического противоопухолевого иммунного ответа. Таким образом, до сих пор существует потребность в композициях и способах, вызывающих или использующих существующие сильные устойчивые Т-клеточные ответы для ингибирования роста, прогрессирования и метастазирования опухоли.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение относится к химерной вирусоподобной частице (VLP), собранной из полипептида, содержащего белок L1 вируса папилломы (ВП), рекомбинантный белок L1 ВП или белок L1 и белок L2 ВП. Химерная VLP согласно настоящему изобретению также содержит целевой(ые) пептид(ы). Целевой пептид в контексте настоящей заявки содержит Т-клеточный эпитоп, распознаваемый уже существующей CD8⁺ Т-клеткой памяти. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения химерная VLP согласно настоящему изобретению содержит целевой(ые) пептид(ы), экспонируемый(ые) на поверхности. В некоторых вариантах осуществления целевой пептид присоединен или конъюгирован с поверхностью VLP, и в некоторых вариантах осуществления целевой пептид рекомбинантно вставлен в белок L1 или L2 таким образом, что целевой пептид экспонируется на поверхности собранной VLP. Целевой пептид содержит Т-клеточный эпитоп из другого человеческого патогена, и в некоторых вариантах осуществления целевой пептид не является пептидом вируса папилломы. В некоторых вариантах осуществления целевой пептид не содержит мышинный эпитоп E7 (амк. 49-57). Изобретение также относится к композициям, содержащим химерные VLP согласно изобретению, и способам применения химерных VLP для лечения рака.

[0006] В одном из аспектов изобретения целевой пептид получен из человеческого патогена, например, вируса, бактерии, гриба или паразита, и не является опехолеассоциированным антигеном. Вирус включает, не ограничиваясь перечисленным, вирус коровьей оспы, вирус ветряной оспы, аденовирус, арбовирус, вирус Эпштейна-Барр, коронавирус, цитомегаловирус, вирус Коксаки, вирус опоясывающего герпеса, краснуху, вирус гепатита, например, вирус гепатита А, или вирус гепатита В, или вирус гепатита С, вирус простого герпеса 1 типа или 2 типа, вирус Джона Каннингема (JC), вирус гриппа типа А или типа В, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус парагриппа, вирус полиомиелита, вирус натуральной оспы, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, риновирус, ротавирус, вирус денге, вирус Эбола, вирус лихорадки Западного Нила, вирус желтой лихорадки или вирус Зика.

[0007] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собрана из белков L1 любого члена семейства Papillomaviridae. В одном из аспектов изобретения белок L1 вируса папилломы представляет собой белок L1 вируса папилломы животных (например, ВП американских кроликов, ВП мышей или ВП быков) или ВП человека (ВПЧ), например, ВПЧ-16, ВЧП-18, ВПЧ-5, ВПЧ-31 и т. д. В одном из аспектов изобретения белок L1 вируса папилломы представляет собой белок L1 вируса папилломы быков (ВПБ) или ВПЧ. В одном из аспектов настоящего изобретения VLP представляет собой RG1-VLP. RG1-VLP собрана из белка L1 ВПЧ-16, модифицированного для презентации аминокислот 17-36 L2 ВПЧ-16 (эпитопа RG1) в поверхностной петле DE L1 ВПЧ-16 (Schellenbacher et al. 2013 J. Invest Dermatol; 133(12):2706-2713; Slupetzky et al., 2007 Vaccine 25:2001-10; Kondo et al. 2008 J. Med. Virol 80; 841-6; Schellenbacher et al. 2009 J. Virol 83:10085-95; Caldeira et al. 2010 Vaccine 28:4384-93.)

[0008] В одном из аспектов изобретения целевой пептид присоединен к VLP. В одном из аспектов изобретения либо N-конец, либо C-конец целевого пептида конъюгирован с аминокислотным остатком на поверхности VLP. Поверхностный остаток может представлять собой, например, цистеин, лизин или аргинин. В данной области техники известно много способов конъюгирования пептида с белком, см., например, источники Bioconjugate Techniques, 3rd Edition (2013) Author, Greg T. Hermanson, Ionescu et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, Jan 2006, 95(1):70-79, и Jones et al., Journal of the American Chemical Society, 2012, 134:1847-1852, включенные в настоящую заявку посредством ссылки на раскрытие таких способов.

[0009] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, затем подвергают восстановительным условиям, достаточным для восстановления дисульфидных связей с сульфгидрильными

группами остатков цистеина в VLP при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид с сульфгидрильной группой посредством дисульфидной связи или малеимидной связи. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения цистеин находится на поверхности VLP. В одном из аспектов настоящего изобретения целевой пептид конъюгирован с сульфгидрильной группой цистеина белка L1 VLP. В одном из аспектов настоящего изобретения целевой пептид конъюгирован с сульфгидрильной группой цистеина белка L2 VLP. В одном из аспектов изобретения цистеин не является частью последовательности полиионный:цистеин, поликатионный:цистеин или полианионный:цистеин. В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, и конъюгируют целевой пептид с сульфгидрильной группой цистеина собранной VLP посредством дисульфидной связи или малеимидной связи, причем реакцию конъюгации проводят в атмосфере азота. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения цистеин находится на поверхности VLP.

[0010] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса и затем подвергают условиям основного pH при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид, содержащий малеимидную группу на N-конце, с первичным амином на лизине и/или гуанидильной группой на остатке аргинина VLP посредством реакции 1,4-присоединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лизин и/или аргинин находятся на поверхности VLP.

[0011] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, затем подвергают восстановительным условиям основного pH при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид, содержащий дибром- или диодмалеимидную группу на его N-конце, с первичной аминогруппой на остатке лизина и/или гуанидильной группой на остатке аргинина VLP посредством реакции 1,4-присоединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лизин и/или аргинин находятся на поверхности VLP.

[0012] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, затем подвергают условиям pH от физиологического до основного при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют N-защищенный целевой пептид, содержащий N-гидроксисукцинимидную сложноэфирную группу на C-конце, с первичной аминогруппой на остатке лизина и/или гуанидильной группой на остатке аргинина на VLP посредством

реакции образования амида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лизин и/или аргинин находятся на поверхности VLP.

[0013] В одном из аспектов изобретения целевой пептид присоединен к петле белка L1 ВП, например, петле BC, CD, DE, EF, FG или HI. В одном из аспектов изобретения целевой пептид присоединен к петле DE, петле HI или петле спирали B4 белка L1 ВПЧ. В одном из аспектов изобретения мишень присоединена к петле спирали B4, например, между аминокислотами 430 и 433 L1 ВПЧ-16, или присоединена к петле DE, например, между аминокислотами 133/134 ВП быков (ВПБ) или эквивалентными аминокислотами 136/137 ВП, включая, не ограничиваясь перечисленным, ВПЧ.

[0014] В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид или VLP не содержит последовательность полиионный:цистеин, поликатионный:цистеин или полианионный:цистеин для прикрепления целевого пептида к VLP с образованием химерной VLP. В одном из вариантов осуществления изобретения ни целевой пептид, ни VLP не содержат последовательность полиионный:цистеин, поликатионный:цистеин или полианионный:цистеин для прикрепления целевого пептида к VLP с образованием химерной VLP согласно настоящему изобретению.

[0015] Целевые пептиды могут быть конъюгированы с VLP посредством дисульфидного связывания, см. источник Pejawar-Gaddy et al. Cancer Immunol Immunother (2010) 59(11):1685-1696, полностью включенный в настоящую заявку посредством ссылки.

[0016] В одном из аспектов изобретения целевой пептид рекомбинантно вставлен в петлю белка L1 ВП, например, петлю BC, CD, DE, EF, FG или HI белка L1 ВП. В одном из аспектов изобретения целевой пептид вставлен в петлю DE или петлю спирали B4 белка L1 ВПЧ. В одном из аспектов изобретения мишень вставлена в петлю спирали B4 между аминокислотами 430 и 433 L1 ВПЧ-16, или вставлена в петлю DE между аминокислотами 133/134 ВП быков (ВПБ) или эквивалентными аминокислотами 136/137 ВПЧ.

[0017] В одном из аспектов изобретения в петлю белка L1 ВП рекомбинантно вставляют заряженный пептид, например, из 9 остатков глутаминовой кислоты или 9 остатков аргинина. Затем целевой пептид конъюгируют с заряженными пептидами в петле. Петля может представлять собой, например, петлю BC, CD, DE, EF, FG или HI белка L1 ВП. В одном из аспектов изобретения целевой пептид конъюгирован с заряженным пептидом в петле DE или петле спирали B4 белка L1 ВПЧ. В одном из аспектов изобретения целевой пептид конъюгирован с заряженным пептидом, вставленным в петлю спирали B4 между аминокислотами 430 и 433 L1 ВПЧ-16, или в петлю DE между аминокислотами 133/134 ВП быков (ВПБ) или эквивалентными

аминокислотами 136/137 ВПЧ.

[0018] В одном из аспектов изобретения VLP собирают сначала из белка L1 или белков L1 и L2 папилломавируса, и затем присоединяют к VLP целевой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, полученный из человеческого патогена, с получением химерной VLP с экспонируемым на поверхности целевым пептидом. В одном из аспектов изобретения целевой пептид присоединяют к белку L1 или L2, и затем собирают VLP таким образом, чтобы целевой пептид был экспонирован на поверхности. Целевой пептид может быть присоединен либо к белку L1, либо к белку L2 VLP, либо к обоим белкам L1 и L2 VLP. Присоединение целевого пептида к VLP может быть осуществлено путем конъюгирования целевого пептида с VLP посредством дисульфидной, малеимидной или амидной связи.

[0019] Химерная VLP также может быть получена рекомбинантно и собрана из белка L1 или белков L1 и L2 вируса папилломы, причем белок L1 или белок L2 встраивают в целевой пептид таким образом, чтобы целевой пептид был экспонирован на поверхности собранной VLP.

[0020] В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид присоединен к VLP с помощью линкера. В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид содержит, по существу состоит из или состоит из CD8⁺ Т-клеточного эпитопа и линкера. В одном из аспектов изобретения линкер содержит аминокислотную(ые) последовательность(и), которая распознается и расщепляется одним или более ферментами, экспрессируемыми опухолевой клеткой или присутствующими в микроокружении опухоли. Сайт(ы) расщепления может быть расположен в целевом пептиде таким образом, что расщепление сайта(ов) высвобождает пептид из целевого пептида, где высвобожденный пептид содержит, по существу состоит из или состоит из CD8⁺ Т-клеточного эпитопа. Высвобожденный пептид способен связываться с ГКГС таким образом, что комплекс распознается уже существующими ЦТЛ, специфичными к CD8⁺ Т-клеточному эпитопу высвобожденного пептида, и активирует их. Фермент может представлять собой, например, фурин, матриксные металлопротеиназы (MMP), например, MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -11, -13, -14 или -19, ADAM (дезинтегрин и металлопротеиназа), например, ADAMS-8, -9, -10, -15, -17 или -28, катепсин, например, катепсин B, D, D, G или H, эластазу нейтрофилов, протеиназу-3, азуридин или ADAMTS-1, или фермент в протеасоме человеческой опухолевой клетки. Сайт ферментативного расщепления может представлять собой, например, RX-K/R-R (SEQ ID NO: 209), где X может представлять собой любую аминокислоту, например, RVKR (SEQ ID NO: 210), или расщепляемый MMP пептидный субстрат, например, Glu-Pro-Cit-Gly-Hof-Tyr-Leu (SEQ ID NO: 211) или

Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln ** (SEQ ID NO: 212), или Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly (SEQ ID NO: 213). В одном из аспектов изобретения сайт расщепления не является сайтом расщепления фурином или сайтом расщепления матриксными металлопротеиназами (MMP). В одном из аспектов изобретения сайт расщепления не является сайтом расщепления одним или более из MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -11, -13, -14 или -19, ADAM (дезинтегрин и металлопротеиназа), например, ADAMS-8, -9, -10, -15, -17 или -28, катепсина, например, катепсина В, D, D, G или H, эластазы нейтрофилов, протеиназы-3, азуроцидина или ADAMTS-1). В одном из аспектов изобретения целевой пептид не содержит сайт ферментативного расщепления.

[0021] В одном из аспектов изобретения целевой пептид содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп одного или более человеческих патогенов, например, паразита, бактерии или вируса.

[0022] Целевой пептид, полученный из такого патогена, предпочтительно представляет собой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, связывающийся с молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I класса. Молекула ГКГС I класса может представлять собой, например, ГКГС I класса семейства HLA-A, В или С. Молекула ГКГС I класса может представлять собой, например, молекулу ГКГС I класса, приведенную в таблице 1 или таблице 2. Молекула ГКГС I класса может представлять собой, например, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01/HLA-A*11:01, HLA-A*0201, HLA-A*020101, HLA-A*0203, HLA-A*0206, HLA-A2, HLA-A2.1 или HLA-A*02.

[0023] В одном из аспектов изобретения патоген представляет собой вирус, включающий, не ограничиваясь перечисленным, вирус коровьей оспы, вирус ветряной оспы, аденовирус, арбовирус, вирус Эпштейна-Барр, коронавирус, цитомегаловирус, вирус Коксаки, вирус опоясывающего герпеса, вирус простого герпеса 1 типа или 2 типа, вирус JC, вирус краснухи, вирус гепатита, например, вирус гепатита А, или вирус гепатита В, или вирус гепатита С, вирус гриппа типа А или типа В, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус парагриппа, вирус полиомиелита, вирус натуральной оспы, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, риновирус, ротавирус, вирус денге, вирус Эбола, вирус лихорадки Западного Нила, вирус желтой лихорадки или вирус Зика. CD8⁺ Т-клеточный эпитоп может быть получен из вируса полиомиелита, вируса кори, вируса Эпштейна-Барр, вируса гриппа, цитомегаловируса (CMV) или вируса гепатита.

[0024] В одном из аспектов изобретения патоген представляет собой бактерию. Неограничивающие примеры такой бактерии включают коклюшную палочку (*bordatella pertussis*), хламидию трахоматис (*chlamydia trachomatis*), столбнячную палочку

(*Clostridium tetani*), дифтерийную палочку, гемофильную палочку (*hemophilus influenza*), менингококк, пневмококк, холерный вибрион (*vibrio cholera*), палочку Коха (*Mycobacterium tuberculosis*), БЦЖ (Бациллу Кальмета-Герена), бактерию брюшного тифа, кишечную палочку (*E. coli*), сальмонеллу, *Legionella pneumophila*, риккетсии, бледную трепонему (*Treponema pallidum*), подвид *pallidum*, стрептококк группы А или группы В, пневмококк (*streptococcus pneumonia*), бациллу антракса (*Bacillus anthracis*), *clostridium botulinum*, виды рода иерсинии (*Yersinia sp.*), например, чумную палочку (*Yersinia pestis*).

[0025] В одном из аспектов изобретения патоген представляет собой паразита. Неограничивающие примеры таких паразитов включают дизентерийную амебу (*Entamoeba histolytica*), токсоплазму гондии (*Toxoplasma gondii*), виды рода трихинеллы (*Trichinella sp.*), например, *Trichinella spiralis*, виды рода трихомонады (*Trichomonas sp.*), например, влагалищную трихомонаду (*Trichomonas vaginalis*), виды рода трипаносомы (*Trypanosoma sp.*), например, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*.

[0026] Изобретение также относится к способам применения химерных VLP и композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования роста, пролиферации и метастазирования опухоли.

[0027] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения химерные VLP согласно настоящему изобретению, как описано в настоящей заявке, находят применение для обнаружения антигенпрезентирующих клеток, содержащих молекулы ГКГС, способные связывать и экспонировать CD8⁺ Т-клеточный эпитоп целевого пептида, и для обнаружения CD8⁺ Т-клеток, распознающих CD8⁺ Т-клеточный эпитоп целевого пептида. Например, спленоциты, полученные от животного с уже существующим иммунным ответом, могут быть культивированы совместно с химерными VLP согласно настоящему изобретению, и совместно культивированные клетки могут быть оценены на предмет повторной активации Т-клеток с использованием, например, иммунофлуоресцентного окрашивания и анализов активации CD8⁺ Т-клеток по интерферону-гамма, известных в данной области техники. Голые VLP, то есть VLP без целевого пептида, могут быть использованы в качестве отрицательных контролей.

[0028] Одним из аспектов изобретения, описанного в настоящей заявке, является способ ингибирования роста, и/или прогрессирования, и/или метастазирования опухоли путем использования уже существующего иммунитета, сформировавшегося в результате ранее перенесенных инфекций и/или вакцинаций против различных патогенов. Способы, описанные в настоящей заявке, основаны на том факте, что большие группы людей подвергаются воздействию различных патогенов или проходят иммунизацию против них.

Кроме того, для последних доступны записи об их иммунизации и вакцинации. Например, большие группы людей в детстве активно проходят вакцинацию против различных патогенов вакцинами, хорошо известными в данной области техники. В способах, описанных в настоящей заявке, специалист в данной области техники может легко установить историю вакцинации/иммунизации или историю инфекционных заболеваний субъекта, имеющего опухоль, и затем ввести подходящую химерную VLP, экспонирующую целевой пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп, родственный вакцине, для активации существующих CD8⁺ Т-клеток памяти субъекта.

[0029] Способ согласно изобретению обладает преимуществами по сравнению с существующими способами, поскольку он не требует идентификации конкретного опухолеассоциированного антигена для нацеливания Т-клеток на конкретную опухоль. Таким образом, способы, описанные в настоящей заявке, могут применяться ко всем опухолям у субъекта, который ранее был вакцинирован против патогена или инфицирован им, для ингибирования их роста, прогрессирования и метастазирования, вне зависимости от опухолеассоциированного антигена, который экспрессируют опухолевые клетки.

[0030] В одном из аспектов изобретения для определения, какие химерные VLP необходимо ввести субъекту, устанавливают, был ли субъект активно иммунизирован вакциной против данного патогена, например, вируса, например, гриппа А, гепатита, кори или полиомиелита, бактерии, например, менингококка, гриба, например, *candida albicans*, или паразита. Затем вводят химерную VLP, содержащую целевой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп из патогена, против которого субъект был иммунизирован. В одном из аспектов изобретения для определения, какие VLP необходимо ввести субъекту, устанавливают, был ли субъект естественным образом инфицирован данным патогеном, например, вирусом, например, гриппа А, гепатита, кори или полиомиелита, бактерией, например, менингококком, грибом, например, *candida albicans*, или паразитом. Затем субъекту вводят химерную VLP, содержащую целевой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп из такого патогена. CD8⁺ Т-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп, связывающий молекулу ГКГС I класса. Неограничивающие примеры CD8⁺ Т-клеточного эпитопа, связывающегося с конкретными молекулами ГКГС I класса, приведены в таблице 1 и таблице 2 (см. источник Rickinson and Moss, *Ann. Rev. Immunology* (1997) 15:405-431, включенный в настоящую заявку посредством ссылки). Способ, описанный в настоящей заявке, может также включать определение того, какую детерминанту(ы) ГКГС I класса экспрессирует субъект, и затем введение химерной VLP, содержащей целевой пептид с CD8⁺ Т-клеточным эпитопом, о котором известно, что он образует комплекс с этой детерминантой(ами) ГКГС I класса.

[0031] Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу ингибирования или предотвращения роста, прогрессирования и/или метастазирования опухоли или пролиферации раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта, включающему стадии определения тканевого источника опухоли, определения, был ли указанный субъект вакцинирован против патогена, обладающего тропизмом к тканевому источнику, или инфицирован им, и введения указанному субъекту химерной VLP, содержащей CD8⁺ Т-клеточный эпитоп указанного патогена или антигенного компонента вакцины. В одном из аспектов изобретения химерные VLP вводят субъекту в количестве, достаточном для стимуляции CD8⁺ Т-клеток, распознающих эпитоп CD8⁺ в комплексе с молекулой ГКГС I класса и перенаправляющих свою цитотоксическую активность на опухоль. В одном из аспектов настоящего изобретения химерные VLP вводят в количестве, достаточном для ингибирования роста, прогрессирования и/или метастазирования опухоли. Химерные VLP также могут быть введены субъекту в количестве, достаточном для ингибирования пролиферации раковых клеток и/или индукции апоптоза раковых клеток.

[0032] Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу ингибирования или предотвращения роста, прогрессирования и/или метастазирования опухоли или пролиферации раковых клеток у нуждающегося в этом субъекта, включающий определение, был ли указанный субъект активно вакцинирован против патогена, обладающего тропизмом к ткани, содержащей опухолевую массу, или инфицирован им, и введение указанному субъекту химерной VLP, содержащей CD8⁺ Т-клеточный эпитоп указанного патогена или антигенного компонента этой вакцины, против которого указанный субъект был иммунизирован. В одном из аспектов изобретения химерные VLP вводят субъекту в количестве, достаточном для стимуляции CD8⁺ Т-клеток, например, тканево-резидентных Т-клеток памяти в ткани, содержащей опухолевую массу, распознающих эпитоп CD8⁺ в комплексе с молекулой ГКГС I класса и перенаправляющих свою цитотоксическую активность на опухоль. В одном из вариантов осуществления изобретения опухолевая масса и ткань, в которой находится опухоль, представляют собой разные типы тканей, например, метастазы опухоли печени в легочную ткань или метастазы опухоли легкого в ткань головного мозга.

[0033] Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу ингибирования или предотвращения роста, прогрессирования и/или метастазирования опухоли или пролиферации раковых клеток, включающему стадии определения, был ли субъект, имеющий опухоль, ранее вакцинирован против патогена, например, паразита, бактерии или вируса, например, одного или более из вируса кори, вируса гриппа, вируса

гепатита или вируса полиомиелита, и затем введения такому пациенту эффективного количества химерной(ых) VLP, содержащей экспонируемый на поверхности целевой пептид, полученный из указанных патогенов, против которых указанный субъект был вакцинирован. Целевой пептид содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп антигенного компонента, содержащегося в вакцине. Один из вариантов осуществления способов согласно настоящему изобретению включает стадию определения, был ли субъект, имеющий опухоль, ранее инфицирован патогеном, например, паразитом, бактерией или вирусом, например, одним или более из вируса кори, вируса гриппа, вируса гепатита или вируса полиомиелита, и затем введения такому пациенту эффективного количества химерной(ых) VLP, содержащей экспонируемый на поверхности пептид, содержащий CD8+ Т-клеточный эпитоп, полученный из таких патогенов. Химерные VLP вводят субъекту в количестве, достаточном для ингибирования роста, прогрессирования и/или метастазирования опухоли. Химерные VLP также могут быть введены субъекту в количестве, достаточном для ингибирования пролиферации раковых клеток и/или индукции апоптоза раковых клеток. Данный способ может дополнительно включать определение, имеет ли субъект, вакцинированный против заданного патогена, Т-клетки памяти против этого патогена, то есть, уже существующие ЦТЛ, распознающие CD8+ Т-клеточный эпитоп патогена. Если у субъекта нет таких ЦТЛ, способ дополнительно включает дополнительную стадию «стимулирования», которая включает повторную вакцинацию субъекта против этого патогена. После повторной вакцинации субъекта химерную VLP, содержащую CD8+ Т-клеточный эпитоп патогена, вводят в количестве, достаточном для связывания опухоли и перенаправления тем самым специфичных к CD8+ Т-клеточному эпитопу ЦТЛ на опухоль со связанной химерной VLP. Способы анализа субъекта на наличие активированных ЦТЛ, специфичных к данному CD8+ Т-клеточному эпитопу, хорошо известны в данной области техники.

[0034] Еще один из вариантов осуществления изобретения относится к способу ингибирования или предотвращения роста, прогрессирования и/или метастазирования опухоли или пролиферации раковых клеток у наивного субъекта, то есть субъекта, не имеющего уже существующих ЦТЛ, специфичных к эпитопу заданного патогена. Наивный субъект включает, например, субъекта, который ранее не был активно вакцинирован против патогена или не подвергался естественной иммунизации им/его воздействию. Клетки субъекта также могут быть проанализированы на наличие ЦТЛ, специфичных к эпитопам заданного патогена. Был ли субъект вакцинирован или подвергнут воздействию патогена может быть определено, например, путем просмотра записей о вакцинации субъекта или опроса субъекта, был ли он вакцинирован или

подвергался ли воздействию, или был ли заражен определенным заболеванием. Способ включает активную вакцинацию нуждающегося в этом наивного субъекта вакциной против заданного патогена. После вакцинации субъекта химерную VLP согласно настоящему изобретению, экспонирующую CD8⁺ Т-клеточный эпитоп указанного патогена, вводят субъекту в количестве, достаточном для связывания химерной VLP с опухолью и перенаправления тем самым специфичных к CD8⁺ Т-клеточному эпитопу ЦТЛ на опухолевые клетки со связанной химерной VLP. Путем перенаправления ЦТЛ на связанные химерной VLP опухолевые клетки рост, прогрессирование и/или метастазирование опухоли или пролиферация раковых клеток ингибируются или предотвращаются. В одном из вариантов осуществления химерную VLP вводят субъекту через 1 неделю, 2 недели или более после вакцинации субъекта, чтобы обеспечить возможность активации ЦТЛ до введения химерной VLP. В одном из вариантов осуществления изобретения наивный субъект проходит вакцинацию против заданного патогена, а затем указанного субъекта наблюдают на наличие активированных клеток ЦТЛ, специфичных к CD8⁺ Т-клеточному эпитопу вакцины. После обнаружения таких активированных ЦТЛ субъекту вводят химерную VLP, содержащую CD8⁺ Т-клеточный эпитоп. Химерную VLP вводят в количестве, достаточном для связывания опухоли и перенаправления ЦТЛ, специфичных к CD8⁺ Т-клеточному эпитопу химерной VLP, на связанные опухоли. Затем перенаправленные ЦТЛ ингибируют или предотвращают рост, прогрессирование и/или метастазирование опухоли или пролиферацию раковых клеток. Вакцина может быть предназначена против любого патогена, как описано в настоящей заявке, например, кори, эпидемического паротита, ветряной оспы или гепатита В.

[0035] Сообщалось, что капсиды ВПЧ (VLP и псевдовирioны (PsV)) обладают тропизмом к опухолям и напрямую связывают и инфицируют опухолевые клетки, включая, например, клетки рака яичника и рака легкого. См. источник Kines et al. *International Journal of Cancer* (15 February 2016) 138(4): 901–911, включенный в настоящую заявку посредством ссылки. Kines сообщает, что такое связывание может быть зависимым от гепарансульфат-протеогликана (HSPG). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, предполагают, что химерные VLP, описанные в настоящей заявке, избирательно связываются с опухолевыми клетками, например, они связываются с опухолевыми клетками в большей степени, чем с неопухолевыми клетками, и присутствие химерных VLP может приводить к положительному на провоспалительные медиаторы микроокружению опухоли, привлекающему инфильтрирующие CD8⁺ Т-клетки. В то же время VLP могут стимулировать ответ адаптивных Т-клеток памяти, возникших в результате предшествующей вакцинации или инфицирования и распознающих CD8⁺ Т-

клеточный эпитоп целевого пептида. Предполагают, что эти сильные ответы способны обходить иммунологическую толерантность и делают опухолевые клетки восприимчивыми к этому уже существующему иммунитету, тем самым ингибируя рост, прогрессирование и метастазирование опухоли.

[0036] Описанные в настоящей заявке химерные VLP или композиция, содержащая химерные VLP, могут быть введены нуждающемуся в этом субъекту внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутрибрюшинно, интраназально, внутриглазным способом, внутрикожно, внутриопухолевым способом, трансмукозально или в виде аэрозоля.

[0037] В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения химерные VLP согласно настоящему изобретению вводят субъекту, имеющему опухоль, в комбинации с другой противораковой терапией, например, радиационной терапией, химиотерапией, иммунотерапией или хирургическим вмешательством. Например, химерные VLP вводят субъекту, имеющему опухоль, в комбинации с ингибитором контрольных точек. Ингибиторы контрольных точек, известные в данной области техники и подходящие для использования в изобретении, включают, не ограничиваясь перечисленным, ипилимумаб (Yervoy®), пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®), атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio), дурвалумаб (Imfinzi). Режимы введения и дозирования для ингибиторов контрольных точек изложены в инструкциях по медицинскому применению препарата для каждого ингибитора контрольных точек, включенных в настоящую заявку посредством ссылки.

[0038] Химиотерапевтические агенты хорошо известны в данной области техники и включают, не ограничиваясь перечисленным, афлиберцепт, аспарагиназу, блеомицин, бусульфан, кармустин, хлорамбуцил, кладрибин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин, даунорубицин, доксорубицин, этопозид, флударабин, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, иринотекан, ломустин, мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, митомицин, митоксантрон, пентостатин, прокарбазин, топотекан, винбластин, винкристин, ретиноевую кислоту, оксалиплатин, карбоплатин, 5-фторурацил, тенипозид, амсакрин, доцетаксел, паклитаксел, винорелбин, бортезомиб, клофарабин, капецитабин, актиномицин D, эпирубицин, виндезин, метотрексат, 6-тиогуанин, типифарниб, иматиниб, эрлотиниб, сорафениб, сунитиниб, дазатиниб, нилотиниб, лапатиниб, гефитиниб, темсиролимус, эверолимус, рапамицин, бозутиниб, пзопаниб, акситиниб, нератиниб, ваталаниб, пазопаниб, мидостаурин, энзастаурин, трастузумаб, цетуксимаб, панитумумаб, ритуксимаб, бевацизумаб, мапатумумаб, конатумумаб и лексатумумаб. Способы применения таких агентов также хорошо известны в данной области техники.

[0039] Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к фармацевтически приемлемой композиции, содержащей химерные VLP согласно настоящему изобретению и один или более носителей или эксципиентов. Композиция может содержать, например, один тип химерной VLP или несколько химерных VLP, таким образом, что по меньшей мере две из химерных VLP не содержат один и тот же целевой пептид.

[0040] Еще один аспект изобретения относится к набору, содержащему химерные VLP согласно изобретению. Набор может содержать инструкции по определению истории вакцинации/иммунизации и/или инфекционных заболеваний субъекта и по введению указанному субъекту подходящей химерной VLP из набора. Подходящая химерная VLP содержит целевой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп патогена, против которого субъект был активно иммунизирован, или патогена, которым субъект был ранее инфицирован. Инструкции могут также включать инструкции по определению комплемента молекулы ГКГС I класса, экспрессируемого указанным субъектом, или экспрессия которого ожидается у указанного субъекта на основании его расового происхождения, и введению подходящей химерной VLP из набора указанному субъекту, где подходящая химерная VLP содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп указанного патогена, который связывается с молекулой ГКГС I класса, экспрессируемой указанным субъектом или экспрессия которой ожидается у указанного субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] На фиг. 1 изображен вариант осуществления способа согласно изобретению, описанному в настоящей заявке. Химерные VLP с целевым пептидом, содержащим иммуногенный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, распознаваемый уже существующим иммунитетом (например, MMR, ветряной оспы, полиомиелита), селективно связываются с опухолевыми клетками, вследствие чего обходится иммунологическая толерантность и уже существующий иммунитет используется для контроля опухолей, связывающих химерные VLP. Субъект в детском возрасте получает несколько одобренных вакцин, вызывающих сильный иммунитет, как Т-клеточного, так и антительного типа (белые точки) (I); во взрослом возрасте у субъекта, к сожалению, развивается рак, проводится оценка истории вакцинации субъекта и ему вводят химерную(ые) VLP согласно настоящему изобретению, содержащую CD8⁺ Т-клеточный эпитоп патогена, против которого субъект был вакцинирован (II). Стимулированные существующие CD8⁺ Т-клетки – вторичный иммунный ответ – перенаправляются для атаки на опухоли, связавшие химерную VLP (III), что приводит к ингибированию роста, прогрессирования и/или метастазирования рака (IV). В одном из вариантов осуществления эпитоп ЦТЛ

может, кроме того, быть получен из вируса с естественным тканевым тропизмом к представляющему интерес органу, где находится опухоль.

[0042] На фиг. 2 показано изображение, полученное с помощью ПЭМ (просвечивающего электронного микроскопа), демонстрирующее, что конъюгированные VLP имеют немного больший размер (60-70 нм) по сравнению с пустыми неконъюгированными VLP (50 нм).

[0043] На фиг. 3 изображен анализ VLP ВПЧ-16 RG-1 методом SDS PAGE (левая секция) или VLP L1 ВПЧ-16 дикого типа (правая секция), конъюгированных с эпитопами, полученными из вирусов гриппа, гепатита В, кори и ветряной оспы.

[0044] На фиг. 4 изображены результаты анализа связывания VLP с опухолевыми клетками методом проточной цитометрии. Сдвиг в клеточной популяции демонстрирует связывание VLP со всеми протестированными линиями опухолевых клеток. В верхнем ряду показаны результаты связывания пустых VLP ВПЧ-16 RG-1 с различными линиями опухолевых клеток, а в нижнем ряду показаны результаты для VLP вируса папилломы быков (ВПБ), в одну из петель L1 которого был рекомбинантно вставлен пептид.

[0045] На фиг. 5 изображены результаты анализа химерной VLP, содержащей целевой пептид, методом проточной цитометрии. Результаты показывают, что способность химерных VLP связывать опухоль не снижалась при конъюгировании пептидов на поверхности VLP.

[0046] На фиг. 6 показана ОТ-1-специфичная активация ЦТЛ, оцененная по окрашиванию на поверхностный CD8 и внутриклеточный IFN- γ с последующим анализом методом проточной цитометрии.

[0047] На фиг. 7 показана Е7-специфичная активация ЦТЛ, оцененная по окрашиванию на поверхностный CD8 и внутриклеточный IFN- γ с последующим анализом методом проточной цитометрии.

[0048] На фиг. 8 изображены результаты биолюминесцентной визуализации на основе экспрессии люциферазы живыми клетками ID8/luc. Эти клетки обычно не распознаются OVA-специфичными CD8⁺ Т-клетками. Результаты показывают, что инкубация с AIR-VLP (химерная VLP, содержащая целевой пептид OVA), но не с пустыми неконъюгированными VLP, привела к распознаванию опухолевых клеток OVA-специфичными CD8⁺ Т-клетками. Инкубация с AIR-VLP привела к наибольшей гибели опухолевых клеток, опосредованной OVA-специфичным уничтожением CD8⁺ Т-клетками, что иллюстрируется значительным снижением люминесцентной активности.

[0049] На фиг. 9 изображены результаты биолюминесцентной визуализации на основе экспрессии люциферазы живыми клетками ID8/luc. Эти клетки обычно не

распознаются амк. 49-57 E7-специфичными ЦТЛ. Опухолевые клетки ID8/luc обрабатывали 0,3 мкг/мл пустых неконъюгированных VLP или химерных VLP-R-E7 (VLP папилломавируса быков, конъюгированные с рестриктированным мышинным H2-DB эпитопом ВПЧ-16-E7 (амк. 49-57), опухолеассоциированной антиген), а затем инкубировали амк. 49-57 E7-специфичные ЦТЛ. Значительно более низкая активность люциферазы наблюдалась для опухолевых клеток ID8, обработанных химерными VLP-R-E7 и инкубированных с E7-специфичными ЦТЛ, что указывает на значительное снижение жизнеспособности опухолевых клеток ID8 после обработки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] Папилломавирусы представляют собой небольшие онкогенные вирусы с двухцепочечной кольцевой ДНК. Оболочки вириона папилломавирусов содержат основной капсидный белок L1 и минорный капсидный белок L2. Известно, что экспрессия белка L1, по отдельности или в комбинации с белком L2, в эукариотических или прокариотических системах экспрессии приводит к сборке капсомеров и VLP. В контексте настоящей заявки термин «капсомер» подразумевает пентамерную сборную структуру из полипептидов L1 папилломавируса (включая полноразмерный белок L1 и его фрагменты). Нативные капсидные белки L1 самособираются посредством межмолекулярных дисульфидных связей с образованием пентамеров (капсомеров).

[0051] Вирион папилломавируса содержит 72 пентамера (капсомера) белка L1. Trus et al., 4 Nat. Struct. Biol. 413-20 (1997). Белок L1 способен к самосборке в капсидоподобные структуры, которые морфологически неотличимы от нативных вирионов при экспрессии в эукариотических клетках. См. источники Buck et al., 82 J. Virol. 5190-97 (2008) и Roy et al., 4 Hum. Vaccin. 5-12 (2008), оба из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки. Мономер L1 содержит 12 β -нитей, 6 петель (BC, CD, DE, EF, FG, HI) и 5 спиралей (H1-H5). Большинство петель в высокой степени выходят на внешнюю поверхность капсида, и присоединение целевого пептида к одной из этих петель, например, посредством дисульфидной связи, малеимидной связи, посредством клик-химии или посредством связывания с полиионным сайтом для прикрепления, как описано в настоящей заявке, в этих областях приведет к тому, что целевой пептид будет экспонироваться на внешней поверхности VLP.

[0052] Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к химерной VLP, содержащей белок L1 вируса папилломы (ВП) или белок L1 ВП и L2 ВП, и целевой пептид, экспонируемый на поверхности. Целевой пептид содержит, по существу состоит из или состоит из CD8⁺ Т-клеточного эпитопа человеческого патогена, где CD8⁺ Т-клеточный эпитоп не является опухолеассоциированным антигеном. В одном

из аспектов настоящего изобретения целевой пептид конъюгирован с восстановленной сульфгидрильной группой цистеина VLP и, необязательно, цистеин не является частью последовательности полиионный:цистеин, поликатионный:цистеин или полианионный:цистеин. VLP может содержать оба белка L1 и L2 папилломавируса. Целевые пептиды могут быть конъюгированы с восстановленной(ыми) сульфгидрильной(ыми) группой(ами) белка L1 и/или белка L2 посредством дисульфидной связи или малеимидной связи. В одном из аспектов настоящего изобретения целевой пептид конъюгирован с лизином и/или аргинином VLP посредством амидной связи.

[0053] В контексте настоящей заявки термин «вирусоподобная частица» или «VLP» относится к частице, состоящей из сборной структуры из капсомеров более высокого порядка. VLP являются неинфекционными и нереплицирующимися, но морфологически схожи с нативным вирионом папилломавируса. Одним примером такой сборной структуры более высокого порядка является частица, которая имеет внешний вид целого (72 капсомера) или по существу целого пустого капсида папилломавируса, имеющего диаметр от около 50 до около 60 нм и икосаэдрическое строение с T=7. Еще одним примером такой сборной структуры более высокого порядка является частица диаметром от около 30 до около 35 нм, размер которой меньше размера вириона нативного папилломавируса, имеющая строение T=1 (содержащая 12 капсомеров). В контексте настоящего изобретения подразумевается, что другие сборные структуры из капсомеров более высокого порядка также охватываются термином VLP. В отдельных вариантах осуществления VLP могут воспроизводить конформационные эпитопы нативного папилломавируса, из которого получен белок или полипептид L1 или белок или полипептид L2. Способы сборки и формирования VLP и капсомеров папилломавируса человека согласно настоящему изобретению хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 6,165,471, 6,153,201 и 9,149,503, а также международную заявку WO 94/020137, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0054] Настоящее изобретение относится к химерным VLP папилломавируса, композициям, содержащим химерные VLP, способам получения химерных VLP и применению химерных VLP для лечения опухолей. Химерные VLP папилломавируса согласно настоящему изобретению содержат целевой пептид. В некоторых вариантах осуществления целевой пептид содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, по существу состоит из эпитопа CD8+ или состоит из CD8+ Т-клеточного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления целевой пептид содержит, по существу состоит из или состоит из CD8+ Т-клеточного эпитопа и линкера для присоединения целевого пептида к VLP. Линкер может

содержать сайт ферментативного расщепления для высвобождения CD8⁺ Т-клеточного эпитопа из VLP. В одном из аспектов изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп принадлежит человеческому патогену, например, паразиту, грибу, бактерии или вирусу. Неограничивающие примеры вирусов включают вирус коревой оспы, вирус ветряной оспы, вирус опоясывающего герпеса, краснуху, вирус гепатита, например, вирус гепатита А, или вирус гепатита В, или вирус гепатита С, вирус гриппа, например, типа А или типа В, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус полиомиелита, вирус натуральной оспы, вирус бешенства, вирус денге, вирус Эбола, вирус лихорадки Западного Нила, вирус желтой лихорадки или вирус Зика.

[0055] Неограничивающие примеры бактерии включают коклюшную палочку (*bordatella pertussis*), хламидию трахоматис (*chlamydia trachomatis*), столбнячную палочку (*Clostridium tetani*), дифтерийную палочку, гемофильную палочку (*hemophilus influenza*), менингококк, пневмококк, холерный вибрион (*vibrio cholera*), палочку Коха (*Mycobacterium tuberculosis*), БЦЖ, бактерию брюшного тифа, кишечную палочку (*E. coli*), сальмонеллу, *Legionella pneumophila*, риккетсии, бледную трепонему (*Treponema pallidum*), подвид *pallidum*, стрептококк группы А или группы В, пневмококк (*streptococcus pneumonia*), бациллу антракса (*Bacillus anthracis*), *clostridium botulinum*, виды рода иерсинии (*Yersinia sp.*), например, чумную палочку (*Yersinia pestis*).

[0056] Неограничивающие примеры паразита включают дизентерийную амёбу (*enamoeba histolytica*), токсоплазму гондии (*toxoplasma gondii*), виды рода трихинеллы (*trichinella sp.*), например, *trichinella spiralis*, виды рода трихомонады (*trichomonas sp.*), например, влагалищную трихомонаду (*trichomonas vaginalis*), виды рода трипаносомы (*trypanosoma sp.*), например, *trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, или плазмодию, например, *plasmodium falciparum*, *plasmodium vivax* или *plasmodium malariae*.

[0057] В одном из аспектов изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп принадлежит вирусу полиомиелита, вирусу кори, вирусу Эпштейна-Барр, вирусу гриппа А, или цитомегаловирусу (CMV), или вирусу гепатита В. В одном из аспектов изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп представляет собой Т-клеточный эпитоп, приведенный в таблице 1. В одном из аспектов изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп представляет собой:

KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6),

YVYDHSGEAVK (SEQ ID NO: 15),

FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69),

FLLTRILTI (SEQ ID NO: 70),

WLSLLVPFV (SEQ ID NO: 71),

GLSRYVARL (SEQ ID NO: 72),
 FLLSLGIHL (SEQ ID NO: 73),
 (K)GILGFVFTL(T)(V) (SEQ ID NO: 217),
 KLSTRGVQIASNEN (SEQ ID NO: 125),
 RGLQRRRFVQNALNGNG (SEQ ID NO: 131),
 FMYSDFHFI (SEQ ID NO: 136),
 NLVPMVATV (SEQ ID NO: 151),
 VAIIEVDNEQPTTRAQKL (SEQ ID NO: 152),
 TRAQKLFAMWRITYKDTV (SEQ ID NO: 153),

Любую 9-мерную последовательность из
 GACVAIIEVDNEQPTTRAQKLFAMWRITYKDTVQLRRKL (SEQ ID NO: 154),
 SVRDRLARL (SEQ ID NO: 167),
 LLDRVRFMGV (SEQ ID NO: 217),
 CLGGLLTMV (SEQ ID NO: 196) или
 GLCTLVAML (SEQ ID NO: 143).
 SLPRSRTPI (SEQ ID NO: 218) или
 SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219).

[0058] В одном из аспектов изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп целевого пептида связывается с молекулой ГКГС I класса. Молекула ГКГС I класса может принадлежать семейству HLA-A, B, C. Молекула ГКГС I класса может представлять собой молекулу ГКГС I класса, приведенную в таблице 1 или таблице 2. Молекула ГКГС I класса может представлять собой, например, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*0201, HLA-A*020101, HLA-A*0203, HLA-A*0206, HLA-A2, HLA-A2.1 или HLA-A*02.

[0059] В одном из аспектов изобретения целевой пептид имеет длину от около 8 аминокислот до около 50 аминокислот, или от около 8 аминокислот до около 45 аминокислот, или от около 8 аминокислот до около 40 аминокислот, длину от около 8 аминокислот до около 35 аминокислот, или длину от около 8 аминокислот до около 30 аминокислот, длину от около 8 аминокислот до около 25 аминокислот, длину от около 8 аминокислот до около 20 аминокислот, длину от около 8 аминокислот до около 15 аминокислот. В одном из аспектов изобретения целевой пептид имеет длину от около 13 до около 50 аминокислот, или длину от около 13 аминокислот до около 45 аминокислот, или длину от около 13 аминокислот до около 40 аминокислот, длину от около 13 аминокислот до около 35 аминокислот, или длину от около 13 аминокислот до около 30 аминокислот, длину от около 13 аминокислот до около 25 аминокислот, длину от около 13

аминокислот до около 20 аминокислот, длину от около 13 аминокислот до около 15 аминокислот. В одном из аспектов изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп может иметь длину, например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 аминокислот.

[0060] В одном из вариантов осуществления изобретения химерная VLP папилломавируса содержит полипептид L1 и целевой пептид. В других вариантах осуществления химерная VLP может содержать полипептид L1 и полипептид L2, и целевой пептид. Полипептид L1 может представлять собой полноразмерный белок L1 или полипептидный фрагмент L1. В конкретных вариантах осуществления полноразмерный белок L1 или полипептидный фрагмент L1 способен собираться в VLP; то есть, полипептид L1 будет самособираться с образованием капсомеров, которые способны самостоятельно собираться в сборные структуры более высокого порядка, тем самым образуя VLP. В более конкретных вариантах осуществления VLP содержат полностью собранный капсид папилломавируса – структуру размером около 50 нм и состоящую из 72 капсомеров или 360 копий белка L1.

[0061] Последовательности L1 известны практически для всех генотипов папилломавируса, идентифицированных на сегодняшний день, и любые из этих последовательностей или фрагментов L1 могут быть использованы в настоящем изобретении. Примеры полипептидов L1 включают, не ограничиваясь перечисленным, полноразмерные полипептиды L1 (например, полипептид L1 ВПЧ-16, SEQ ID NO: 205), усеченные L1, в которых отсутствует нативный С-конец, усеченные L1, в которых отсутствует нативный N-конец, и усеченные L1, в которых отсутствует внутренний домен. См. источники Conway et al., 88(4) J. Dental Res. 307-17 (2009); Chen et al., 5 Mol. Cell. 557-67 (2000); и Painsil et al., 223(1) Virology 238-44 (1996), все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Белок L1 может представлять собой, например, модифицированный белок L1, например модифицированный белок L1 ВПЧ-16, в котором аминокислоты 17–36 L2 ВПЧ-16 (эпитоп RG1) вставлены в поверхностную петлю DE L1 ВПЧ-16 (Schellenbacher et al. 2013 J. Invest Dermatol; 133(12):2706-2713; Slupetzky et al., 2007 Vaccine 25:2001-10; Kondo et al. 2008 J. Med. Virol 80; 841-6; Schellenbacher et al. 2009 J. Virol 83:10085-95; Caldeira et al. 2010 Vaccine 28:4384-93.)

[0062] Полипептид L2 может представлять собой полноразмерный белок L2 или полипептидный фрагмент L2. Последовательности L2 известны практически для всех генотипов папилломавируса, идентифицированных на сегодняшний день, и любая из этих последовательностей или фрагментов L2 может быть использована в настоящем изобретении. Примеры полипептидов L2 включают, не ограничиваясь перечисленным, полноразмерные полипептиды L2 (например, полипептид L2 ВПЧ-16, SEQ ID NO: 207),

усеченные L2, в которых отсутствует нативный С-конец, усеченные L2, в которых отсутствует нативный N-конец, и усеченные L2, в которых отсутствует внутренний домен.

[0063] VLP папилломавируса могут быть образованы с использованием полипептидов L1 и необязательно L2 от любого папилломавируса животных, или их производных или фрагментов. Таким образом, любые известные (или обнаруженные в будущем) последовательности L1 и необязательно L2 папилломавирусов человека, быка, лошади, овцы, свиньи, оленя, собаки, кошки, грызуна, кролика и т. д. могут быть использованы для получения VLP или капсомеров согласно настоящему изобретению. См. источник de Villiers et al., *Virology* 324: 17-27 (2004), где приведен почти полный список генотипов папилломавирусов и их родства, включенный в настоящую заявку посредством ссылки.

[0064] В отдельных вариантах осуществления полипептиды L1 и необязательно L2, используемые для образования VLP, получены из вируса папилломы, отличного от человеческого, или вируса папилломы человека, генотип которого отличен от ВПЧ-6, ВПЧ-11, ВПЧ-16 и ВПЧ-18. Например, белки L1 и/или L2 могут быть получены из ВПЧ-1, 2, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -15, -17, -23, -27, -31, -33, -35, -38, -39, -45, -51, -52, -58, -66, -68, -70, -76 или -92.

[0065] В частных вариантах осуществления химерная VLP (вне зависимости от того, содержит ли она полипептид L1 или полипептиды L1 и L2) содержит участок отрицательно заряженных аминокислот в расположенной на поверхности области, который способен связываться с целевым пептидом, содержащим участок положительно заряженных аминокислот. В дополнительных вариантах осуществления участок отрицательно заряженных аминокислот может быть фланкирован с одной или обеих сторон одним или более остатками цистеина (называемыми полианионный:цистеин или, более конкретно, полиглутаминовая кислота:цистеин или полиаспарагиновая кислота:цистеин). В таких случаях конъюгация VLP и целевого пептида будет результатом нековалентного связывания между комплементарными зарядами аминокислот VLP и целевого пептида и дисульфидной связи между цистеинами. В других вариантах осуществления цистеин(ы) находится на расстоянии одной или более аминокислот от участка заряженных аминокислот, вследствие чего любая вторичная/третичная структура будет приводить участок заряженных аминокислот в непосредственную близость от цистеина(ов). См., например, публикацию патентной заявки США № 2014/0050753, опубликованную 20 февраля 2014 г., полностью включенную в настоящую заявку посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп,

например, CD8⁺ Т-клеточные эпитопы из таблицы 1 или таблицы 2, и полиионный цистеин для присоединения целевого пептида к VLP, содержащей комплементарную последовательность полиионный цистеин. В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид содержит, по существу состоит из или состоит из CD8⁺ Т-клеточного эпитопа и полиионного цистеина для присоединения целевого пептида к VLP, содержащей комплементарную последовательность полиионный цистеин, и сайта ферментативного расщепления, расположенного между концевым цистеином и CD8⁺ Т-клеточным эпитопом. В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид содержит, по существу состоит из или состоит из концевого цистеина, CD8⁺ Т-клеточного эпитопа, например, CD8⁺ Т-клеточных эпитопов из таблицы 1 или таблицы 2, и сайта ферментативного расщепления, расположенного между концевым цистеином и CD8⁺ Т-клеточным эпитопом.

[0066] Отрицательно заряженные аминокислоты, которые могут быть использованы при получении химерной VLP, включают, например, глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту. Эти аминокислоты могут быть использованы по отдельности (например, полиглутаминовая кислота) или в комбинации. В конкретном варианте осуществления участок содержит глутаминовую кислоту. Количество отрицательно заряженных аминокислот может варьироваться и может включать от около 4 до около 20 аминокислот, от около 6 до около 18 аминокислот, от около 8 до около 16 аминокислот и тому подобное. В конкретном варианте осуществления участок содержит около 8 отрицательно заряженных аминокислот. В более конкретном варианте осуществления участок содержит EEEEEEEEC (E8C) (SEQ ID NO: 214). В еще одном варианте осуществления участок содержит CEEEEEEEC (SEQ ID NO: 215). Способы конъюгирования целевых пептидов с VLP посредством дисульфидной связи см., например, в источнике Pejawar-Gaddy et al. *Cancer Immunol Immunother* (2010) 59(11):1685-1696, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Вкратце, наличие полиаргинин-цистеинового фрагмента на целевом пептиде позволяет прикреплять пептид к полианионному сайту (EEEEEEEC, E8C (SEQ ID NO: 214)), присутствующему в различных петлях частиц L1. Ковалентная сшивка между двумя остатками цистеина должна сделать эту связь необратимой в окислительных условиях. Для реакций конъюгирования очищенные частицы ВПЧ подвергают диализу в буфере для конъюгации (20 mM Трис/HCl, pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5% глицерин, 0,5 mM CaCl₂), а затем добавляют пептид и окисляющие реагенты, позволяя реакции протекать в течение 16 часов при 4 °C. По завершении инкубации реакционные смеси наносят на колонку для эксклюзионной хроматографии (Sephadex G-100, Pharmacia, объем 20 мл, скорость потока

1 мл/мин, 10 mM Трис/HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂) для удаления неконъюгированного пептида и замены буфера. Конъюгированные частицы, которые элюируются в объеме пустот, идентифицируют по присутствию белка L1 на SDS-PAGE. Конъюгированные частицы анализируют с помощью электронной микроскопии. Специалист в данной области техники может посредством обычных экспериментов создать VLP, включающую полиионный участок в расположенной на поверхности области (например, одной или более петлях), и способную собираться в VLP.

[0067] В альтернативных вариантах осуществления химерная VLP папилломавируса сконструирована так, что она содержит участок положительно заряженных аминокислот и один или более цистеинов (поликатионный:цистеин) в расположенной на поверхности области, способный связываться с целевым пептидом, содержащим участок отрицательно заряженных аминокислот и один или более цистеинов (полианионный:цистеин).

[0068] В конкретных вариантах осуществления химерная VLP содержит полипептид L1 (например, полноразмерный), где аминокислотный участок полианионный:цистеин вставлен в одну или более петель полипептида L1 (например, петлю HI). Такие участки могут, например, быть вставлены в аминокислотную последовательность, кодирующую конкретную петлю (без делеции соответствующих аминокислот L1), быть вставлены с заменой аминокислот L1 в петле, или даже быть вставлены с частичной делецией аминокислот L1 кислоты в конкретной петле). В конкретных вариантах осуществления химерная VLP содержит полипептид L2 (например, полноразмерный), в который вставлен аминокислотный участок полианионный:цистеин. Вставка может быть осуществлена без делеции соответствующих аминокислот L2, или она может быть осуществлена при делеции аминокислот из полипептида L2. Специалист в данной области техники может посредством обычных экспериментов оптимизировать химерную VLP для размещения полианионных аминокислотных последовательностей для соответствия конкретным целевым пептидам.

[0069] В качестве альтернативы, для присоединения целевых пептидов к VLP белки L1 и/или L2 VLP также могут быть модифицированы путем включения по меньшей мере одной первой неприродной аминокислоты (также называемой в настоящей заявке неприродной аминокислотой или неканонической аминокислотой (nnAA)) в представляющий интерес сайт, и два или более целевого пептида могут быть модифицированы путем включения по меньшей мере одной второй неприродной аминокислоты, где первая неприродная аминокислота отличается от второй неприродной аминокислоты и реагирует с ней. См., например, публикацию патентной заявки США №

2016/0206715, опубликованную 21 июля 2016 г., включенную в настоящую заявку посредством ссылки. Примером одной первой неприродной аминокислоты является азидогомоаланин. Примером второй неприродной аминокислоты является пропаргиллоксифенилаланин. Азидная функциональная группа азидогомоаланина, включенная в капсидный белок VLP, может участвовать в клик-реакции (3+2)-циклоприсоединения с алкиновой функциональной группой пропаргиллоксифенилаланина, включенного в целевой пептид, в результате чего VLP сшивается с целевым пептидом. Другие содержащие неприродные аминокислоты капсидные белки в одной и той же VLP могут аналогичным образом участвовать в клик-реакции (3+2)-циклоприсоединения с образованием VLP с двумя или более целевыми пептидами. В еще одном варианте осуществления химерная VLP может экспонировать целевой пептид и CpG. В еще одном варианте осуществления химерная VLP может экспонировать целевой пептид и нуклеиновую кислоту или модифицированную нуклеиновую кислоту. В еще одном варианте осуществления химерная VLP может экспонировать два или более целевого пептида и CpG. В отдельном варианте осуществления химерная VLP может экспонировать два или более целевого пептида и нуклеиновую кислоту или модифицированную нуклеиновую кислоту.

[0070] В одном из вариантов осуществления изобретения VLP содержит по меньшей мере одну или по меньшей мере две неприродные аминокислоты на капсидную мономерную субъединицу. Например, по меньшей мере одна двадцатая от общего количества неприродных аминокислот в VLP может быть использована для присоединения целевого пептида или нуклеиновой кислоты с получением химерной VLP. В еще одном варианте осуществления около одной четвертой от общего количества неприродных аминокислот в VLP может быть использовано для присоединения целевого пептида или нуклеиновой кислоты. В дополнительном варианте осуществления около одной трети от общего количества неприродных аминокислот в VLP может быть использовано для присоединения целевого пептида или нуклеиновой кислоты. В еще одном варианте осуществления около половины от общего количества неприродных аминокислот в VLP может быть использовано для присоединения целевого пептида или нуклеиновой кислоты.

[0071] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, затем подвергают восстановительным условиям, достаточным для восстановления сульфгидрильных групп остатков цистеина на поверхности VLP при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид с сульфгидрильной группой посредством дисульфидной

связи или малеимидной связи. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения цистеин находится на поверхности VLP. В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, и конъюгируют целевой пептид с сульфгидрильной группой цистеина посредством дисульфидной связи или малеимидной связи, причем реакцию конъюгации проводят в атмосфере азота. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения цистеин находится на поверхности VLP.

[0072] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, и затем подвергают условиям основного pH при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид, содержащий малеимидную группу на N-конце, с первичным амином на лизине и/или гуанидильной группой на остатке аргинина VLP посредством реакции 1,4-присоединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лизин и/или аргинин находятся на поверхности VLP.

[0073] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, затем подвергают восстановительным условиям основного pH при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид, содержащий дибром- или диодмалеимидную группу на его N-конце, с первичной аминогруппой на остатке лизина и/или гуанидильной группой на остатке аргинина VLP посредством реакции 1,4-присоединения. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лизин и/или аргинин находятся на поверхности VLP.

[0074] В одном из аспектов настоящего изобретения VLP собирают из белка L1 или белка L1 и белка L2 папилломавируса, затем подвергают условиям основного pH при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгируют целевой пептид, содержащий N-гидроксисукцинимидную сложноэфирную группу на C-конце, с первичной аминогруппой на остатке лизина и/или гуанидильной группой на остатке аргинина посредством реакции образования амида. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лизин и/или аргинин находятся на поверхности VLP.

[0075] Вместо присоединения целевого пептида к VLP посредством, например, связывания отрицательно и положительно заряженных аминокислот или конъюгации на основе малеимида, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая целевой пептид, может быть вставлена в нуклеиновую кислоту, кодирующую белок L1 и/или белок L2, таким образом, что при экспрессии продуцируется слитый белок, в котором целевой пептид вставлен в петлю полипептида L1 и/или в белок L2 и экспонируется на

поверхности VLP.

[0076] Кроме того, в одном из вариантов осуществления изобретения в химерной VLP по меньшей мере одна десятая белков вирусной оболочки может экспонировать целевой пептид. В еще одном варианте осуществления по меньшей мере одна пятая белков вирусной оболочки может экспонировать целевой пептид. В еще одном варианте осуществления около половины белков вирусной оболочки может экспонировать целевой пептид. В еще одном варианте осуществления около двух третьих белков вирусной оболочки может экспонировать целевой пептид. В еще одном варианте осуществления почти все белки вирусной оболочки могут экспонировать целевой пептид.

[0077] В еще одном варианте осуществления изобретения VLP или целевые пептиды могут дополнительно включать один или более агентов из группы: ГМ-КСФ, ИЛ-15, Pam3SK4, poly (I:C), LPS, флагеллин, имихимод и CpG-X, и MPL.

[0078] Генетические конструкции, кодирующие белок L1 (например, полипептид L1 полной или частичной длины) и, необязательно, белок L2 (например, полипептид L2 полной или частичной длины), с последовательностью, кодирующей целевой пептид, или без нее, могут быть получены в соответствии со стандартными рекомбинантными методами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Молекулы ДНК, кодирующие различные полипептидные компоненты, лигируют друг с другом с образованием внутрирамочного слияния генов, которое приводит, например, к единственной открытой рамке считывания, экспрессирующей, например, полиионный капсидный полипептид папилломавируса (L1 или L1/L2), или капсидный полипептид папилломавируса (L1 или L1/L2), содержащий целевой пептид. Кодирующие последовательности ДНК или открытые рамки считывания, кодирующие целые или частичные полипептиды L1 и/или L1/L2, могут быть лигированы с подходящими регуляторными элементами, обеспечивающими экспрессию (т. е. транскрипцию и трансляцию) белка, кодируемого молекулой ДНК. Эти регуляторные последовательности, обычно промоторы, энхансерные элементы, лидерные последовательности, сигналы терминации транскрипции и т. д., хорошо известны в данной области техники.

[0079] В частных вариантах осуществления VLP с целевым пептидом или без него образуются в клетках насекомых Sf-9 при экспрессии белка L1 с использованием рекомбинантного бакуловируса. Общие методы работы с бакуловирусными векторами и бакуловирусной ДНК и их получения, а также методики культивирования клеток насекомых, известны специалистам в данной области техники. См., например, источники Volpers et al., 69 J. Virol. 3258-64 (1995); Kirnbauer et al., 67(12) J. Virol. 6929-36 (1993); Kool et al., 130 Arch. Virol. 1-16 (1993); Rose et al., 67(4) J. Virol. 1936-44 (1993); и

публикацию патентной заявки США № 20140050753, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[0080] Когда для последующей трансформации выбрана прокариотическая клетка-хозяин, промоторная область, используемая для конструирования молекулы рекомбинантной ДНК, должна подходить для конкретного хозяина. Как хорошо известно в данной области техники, последовательности ДНК промоторов эукариот для экспрессии в эукариотических клетках-хозяевах отличаются от последовательностей промоторов прокариот. Промоторы эукариот и сопутствующие генетические сигналы могут не распознаваться или не функционировать в прокариотической системе, и, кроме того, промоторы прокариот не распознаются и не функционируют в эукариотических клетках.

[0081] Таким образом, молекулы ДНК, кодирующие полипептидные продукты, подлежащие экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, могут быть клонированы в подходящий вектор экспрессии с использованием стандартных методик клонирования, известных в данной области техники, включая расщепление рестрикционными ферментами и лигирование ДНК-лигазой, как описано в источниках Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, NY (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2008), каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Рекомбинантные молекулы, включая плазмиды, могут быть введены в клетки путем трансформации, в частности, трансдукции, конъюгации, мобилизации или электропорации. После введения этих рекомбинантных плазмид в одноклеточные культуры, включая прокариотические организмы и эукариотические клетки, клетки выращивают в тканевой культуре, и векторы могут быть реплицированы.

[0082] Для рекомбинантной экспрессии белка L1 папилломавируса (и, необязательно, белка L2) и получения в результате сборной структуры VLP рекомбинантные векторы, полученные выше, используют для инфицирования клетки-хозяина. Может быть использовано любое количество комбинаций вектор-хозяин, включая векторы для растительных клеток (*Agrobacterium*) и растительные клетки, дрожжевые векторы и клетки-хозяева дрожжей, бакуловирусные векторы и клетки-хозяева насекомых, векторы на основе вируса коровьей оспы и клетки-хозяева млекопитающих или плазмидные векторы в *E. coli*. Дополнительные векторы экспрессии млекопитающих включают векторы, полученные из аденовируса, аденоассоциированного вируса, нодавируса и ретровирусов.

[0083] В альтернативных вариантах осуществления рекомбинантные векторы экспрессии и регуляторные последовательности, подходящие для экспрессии VLP

папилломавируса в клетках дрожжей или млекопитающих, хорошо известны и могут быть использованы в настоящем изобретении. См., например, источники Buonamassa et al., 293(2) *Virology* 335-44 (2002); Sasagawa et al., 2016 *Virology* 126-95 (1995); Hagensee et al., 67(1) *J. Virol.* 315-22 (1993). См. также патент США № 7,112,330 и публикацию патентной заявки США № 2008016637, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0084] Независимо от системы вектор-хозяин, используемой для рекомбинантной экспрессии и самосборки капсомеров и/или VLP, эти продукты могут быть выделены из клеток-хозяев, а затем очищены с использованием известных методов. В одном из вариантов осуществления химерные VLP папилломавируса могут быть очищены центрифугированием в градиенте CsCl или сахарозы. См. Sasagawa et al., 2016 *Virology* 126-95 (1995); Volpers et al., 69 *J. Virol.* 3258-64 (1995); Rose et al., 75 *J. Gen. Virol.* 2445-49 (1994); Kirnbauer et al., 67(12) *J. Virol.* 6929-36 (1993); Rose et al., 67(4) *J. Virol.* 1936-44 (1993). По существу чистые препараты VLP могут быть конъюгированы с целевым пептидом и затем использованы в способах согласно настоящему изобретению.

[0085] В одном из вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящей заявке, белок L1 и белок L2 по существу являются версиями дикого типа, за исключением присоединения или вставки целевого пептида и изменений в последовательностях L1 и L2, необходимых для присоединения. Однако специалисту будет ясно, что также могут быть использованы варианты белка L1 и L2 при условии, что белок может допускать вставку или присоединение подходящего целевого пептида и может собираться в VLP или по меньшей мере в пентамер (капсомер). Было описано несколько примеров таких вариантов. Например, можно использовать усеченный L1, лишенный до 10 аминокислот с его N-конца или лишенный до 30 аминокислот с его C-конца. (См., например, источники Chen et al., *J Mol Bio* 2001 Mar. 16; 307(1):173-82, или Bishoop et al. (2007) *Journal of Biological Chemistry* 282, 31803-31811, оба из которых включены посредством ссылки на раскрытие в них получения и применения таких усеченных белков L1). В еще одном варианте осуществления может быть использован небольшой слитый пептид, полученный с пептидом из около 60 аминокислот. (См., например, источник *Virology* 1997 Jul. 21; 234(1):93-111, включенный посредством ссылки на раскрытие в нем таких слитых пептидов.) В еще одном варианте осуществления могут быть использованы гибридные молекулы L1, в которых одна часть молекулы первого штамма ВП заменяется на молекулу L1 второго штамма ВП. Например, может быть осуществлен обмен отдельных функциональных частей молекулы L1, таких как расположенные на внешней поверхности «петли» белка, между молекулами разных штаммов ВП. Примеры таких гибридных

белков L1 см., например, в источниках Christensen et al., *Virology* 2001 Dec. 20: 291(2):324-34 или Oroczo et al. (2005) *J Virol* 79, 9503-9514, оба из которых включены посредством ссылки на раскрытие в них таких гибридных белков L1. Другие типы вариантов будут очевидны специалисту. См., например, источники Carter et al., *J Virol* 2006 May; 80(10):4664-72; White et al. (1999) *J Virology* 73, 4882-4889; или Roden et al. (1997) *J Virol* 71, 6247-52, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки на раскрытие в них других типов подходящих вариантов L1. Еще одним подходящим примером белка L1 для применения в химерных VLP согласно настоящему изобретению является белок L1 ВПЧ-16, модифицированный для презентации аминокислот 17-36 L2 ВПЧ-16 (эпитопа RG1) в поверхностной петле DE L1 ВПЧ-16 (Schellenbacher et al. 2013 *J. Invest Dermatol*; 133(12):2706-2713; Slupetzky et al., 2007 *Vaccine* 25:2001-10; Kondo et al. 2008 *J. Med. Virol* 80; 841-6; Schellenbacher et al. 2009 *J. Virol* 83:10085-95; Caldeira et al. 2010 *Vaccine* 28:4384-93, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки).

[0086] Целевой пептид может быть встроен в белок L1 или L2 или на него в любом из множества сайтов белка, при условии, что вставка экспонируется на поверхности VLP и не препятствует способности белка собраться в VLP. Кристаллизация VLP L1 ВПЧ-16 выявила атомную структуру вирусного капсида, в частности, гипервариабельные поверхностные петли, содержащие иммунодоминантные и конформационно-зависимые эпитопы, которые распознаются нейтрализующими антителами и определяют серотип вируса (Chen et al. (2000) *Molecular Cell* 5, 557-567, включенный в настоящую заявку посредством ссылки). Соответственно, подходящие сайты для вставки или присоединения целевого пептида в белке L1 будут очевидны специалисту.

[0087] Целевой пептид может быть вставлен или присоединен к любой из петель BC, CD, DE, EF, FG, HI полипептида L1 папилломавируса. В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид присоединен к петле DE L1 или вставлен в нее, например, между аминокислотами 133 и 134 ВПБ-1, между аминокислотами 136 и 137 L1 ВПЧ-16 или между эквивалентными сайтами молекул L1 других папилломавирусов. В других вариантах осуществления изобретения целевой пептид присоединен к петле спирали B4 или вставлен в нее (например, между аминокислотами 430 и 433 L1 ВПЧ-16).

[0088] Белок L1, к которому присоединен или в который вставлен целевой пептид, может принадлежать любому из множества типов (штаммов/генотипов) папилломавируса (ВП), например, ВП человека (например, ВПЧ-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -11, -15, -16, -17, -18, -23, -27, -31, -33, -35, -38, -39, -45, -51, -52, -58, -66, -68, -70, -76 или -92), ВП быков

(например, ВПБ-1, ВПБ-2, ВПБ-4, ВПБ-6) или оральному ВП собак (COPU).

[0089] В контексте настоящей заявки термин «антиген» означает молекулу, способную к связыванию Т-клеточным рецептором. Антиген дополнительно способен индуцировать гуморальный ответ и/или клеточный иммунный ответ, приводящий к стимуляции В- и/или Т-лимфоцитов, и предпочтительно в контексте изобретения, описанного в настоящей заявке, антиген стимулирует CD8⁺ Т-лимфоциты, будучи в комплексе с молекулой ГКГС I класса. Структурный аспект антигена, вызывающий биологический ответ, называется в настоящей заявке «антигенной детерминантой» или «эпитопом», и указанные названия являются синонимами. В-лимфоциты реагируют на чужеродные антигенные детерминанты посредством выработки антител, тогда как Т-лимфоциты являются медиатором клеточного иммунитета. Таким образом, антигенные детерминанты или эпитопы представляют собой части антигена, которые распознаются антителами или, в контексте ГКГС, Т-клеточными рецепторами. Антигенная детерминанта или эпитоп не обязательно должны представлять собой непрерывную/последовательную последовательность или сегмент белка, и могут включать различные последовательности, непосредственно не соседствующие друг с другом.

[0090] Что касается конкретной аминокислотной последовательности, «эпитоп» представляет собой набор аминокислотных остатков, участвующих в распознавании конкретным иммуноглобулином, или, в контексте Т-клеток, – остатков, необходимых для распознавания Т-клеточными рецепторными белками и/или рецепторами ГКГС. Аминокислотные остатки эпитопа не обязательно должны быть смежными/последовательными. В контексте иммунной системы, *in vivo* или *in vitro*, эпитоп представляет собой совокупность признаков молекулы, таких как первичная, вторичная и третичная структура пептида и заряд, которые в совокупности образуют сайт, распознаваемый иммуноглобулином, Т-клеточным рецептором или молекулой HLA.

[0091] В контексте настоящей заявки «Т-клеточный эпитоп» означает признак пептида или белка, который в ассоциации с молекулой ГКГС на поверхности клетки распознается Т-клеточным рецептором при инициации иммунологического ответа на пептид, содержащий этот антиген. Обычно считается, что распознавание Т-клеточного эпитопа Т-клеткой происходит посредством механизма, при котором Т-клетки распознают пептидные фрагменты антигенов, связанные с молекулами ГКГС I класса или II класса, экспрессируемыми на антигенпрезентирующих клетках. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевые пептиды, содержащие Т-клеточный эпитоп и химерные VLP, описанные в настоящей заявке, находят применение для

обнаружения антигенпрезентирующих клеток, имеющих молекулы ГКГС, способные связывать и экспонировать Т-клеточные эпитопы целевых пептидов. Для Т-клеточного эпитопа обычно требуется короткий пептид, связанный с молекулой ГКГС I или II класса, образуя тройной комплекс (альфа-цепь ГКГС I класса, бета-2-микроглобулин и пептид), который может распознаваться Т-клеткой, несущей соответствующую Т-клеточную молекулу, связывающуюся с комплексом ГКГС/пептид с подходящей аффинностью. Пептиды, связывающиеся с молекулами ГКГС I класса, обычно имеют длину от 8 до 14 аминокислот, и чаще всего длину 9 аминокислот.

[0092] В контексте настоящей заявки термин «ВПЧ» и «папилломавирус человека» относится к членам семейства папилломавирусов, способным инфицировать людей. Существует две основные группы ВПЧ, определяемые их тропизмом (генитальная/мукозальная и кожная группы), каждая из которых содержит несколько вирусных «типов» или «штаммов/генотипов» (например, ВПЧ-16, ВПЧ-18, ВПЧ-31, ВПЧ-32 и т. д.).

[0093] По данным Всемирной организации здравоохранения, «вакцина представляет собой биологический препарат, который повышает иммунитет к конкретному заболеванию. Вакцина обычно содержит агент, имеющий сходство с вызывающим заболевание микроорганизмом и часто производимый из ослабленных или убитых форм микроба, его токсинов или одного из его поверхностных белков. Указанный агент стимулирует иммунную систему организма к распознаванию указанного агента как чужеродного, его уничтожению и «запоминанию», чтобы иммунная система могла легче распознать и уничтожить любой из этих микроорганизмов, с которыми она впоследствии столкнется». См. www.who.int/topics/vaccines/en/.

[0094] Термин «вакцина на основе VLP» относится к препарату, содержащему 1, 2, 3, 4, 5 или более химерных VLP согласно настоящему изобретению. Композиции, содержащие химерную VLP согласно настоящему изобретению, обычно находятся в форме, подходящей для введения субъекту для перенаправления существующего иммунитета и ингибирования пролиферации, роста и/или метастазирования опухоли. Как правило, вакцина на основе VLP содержит обычный физиологический раствор или забуференный водный раствор, в котором композиция согласно настоящему изобретению суспендирована или растворена, однако также предусмотрено введение сухого порошка, например, путем ингаляции, и даже препарата с дополнительным адъювантом, таким как квасцы. Композиция согласно настоящему изобретению может быть использована для ингибирования пролиферации, роста и/или метастазирования опухоли. При введении в организм хозяина композиция, содержащая химерные VLP согласно изобретению

(например, вакцина на основе VLP), способна вызывать иммунный ответ, включая, не ограничиваясь перечисленным, выработку цитокинов и/или активацию цитотоксических Т-клеток, антигенпрезентирующих клеток, хелперных Т-клеток, дендритных клеток и/или другие клеточные ответы.

[0095] В контексте настоящей заявки «терапевтические» композиции представляют собой композиции, предназначенные и вводимые пациентам, имеющим опухоль. Терапевтические композиции (например, терапевтические химерные VLP-содержащие композиции) используют для лечения доброкачественных или злокачественных опухолей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерные VLP вводят субъекту, ранее имевшему опухоль и в настоящее время, по-видимому, не имеющему опухоли/рака, с целью ингибировать рецидив опухоли/рака.

[0096] Термины «ингибирование», «уменьшение» или «предотвращение», или любое видоизменение этих терминов при использовании в формуле изобретения и/или описании включают любое измеримое уменьшение или полное ингибирование для достижения желаемого результата, такого как ингибирование, уменьшение или предотвращение роста, пролиферации и/или метастазирования опухоли.

[0097] На протяжении всего текста настоящей заявки термин «около» используется для обозначения того, что значение включает стандартное отклонение погрешности, обусловленной устройством или способом, используемым для определения значения.

[0098] «Субъект» или «нуждающийся в этом субъект» в контексте настоящей заявки включает любое животное, имеющее опухоль/рак или имевшее опухоль/рак. Подходящие субъекты (пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик, морская свинка или свинья), сельскохозяйственных животных (таких как крупный рогатый скот), животных, участвующих в спортивных состязаниях (таких как собаки или лошади), домашних животных или домашних любимцев (таких как лошадь, собака или кошка), отличных от человека приматов и людей.

[0099] Термины «белок», «полипептид» и «пептид» в контексте настоящей заявки не ограничены каким-либо конкретным количеством аминокислот; эти термины иногда используются в настоящей заявке взаимозаменяемо. Свойства и аминокислотные последовательности белков согласно изобретению и кодирующих их нуклеиновых кислот хорошо известны и могут быть определены обычным образом, а также загружены из различных известных баз данных. См., например, базы данных NCBI GenBank. Некоторые последовательности приведены в настоящей заявке. Однако некоторая информация о последовательности регулярно обновляется (например, для исправления ошибок в предыдущих записях), поэтому обновленная (исправленная) информация о белках и

кодирующих их нуклеиновых кислотах включена в настоящую заявку. Информация, представленная в базах данных последовательностей, обсуждаемых в настоящей заявке, включена в настоящую заявку посредством ссылки.

[0100] В контексте настоящей заявки термин «химерная VLP» подразумевает VLP, содержащие целевой пептид. Этот термин не подразумевает какого-либо значения, касающегося конкретного вида связывания или присоединения целевого пептида к VLP, или конкретного вида вставки целевого пептида в VLP. В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид конъюгирован с VLP посредством дисульфидной связи, малеимидной или амидной связи.

[0101] Термин «ВПЧ» и «папилломавирус человека» относится к членам семейства папилломавирусов, способным инфицировать людей. Существует две основные группы ВПЧ, определяемые их тропизмом (генитальная/мукозальная и кожная группы), каждая из которых содержит несколько вирусных «типов» или «штаммов» (например, ВПЧ-5, ВПЧ-16, ВПЧ-18, ВПЧ-31, ВПЧ-32 и т. д.).

[0102] «Ингибитор контрольных точек» представляет собой тип лекарственного средства, блокирующего отдельные белки, называемые «белками контрольных точек», которые вырабатываются некоторыми типами клеток иммунной системы, такими как Т-клетки, и некоторыми раковыми клетками. Белки контрольных точек помогают контролировать иммунные ответы и могут препятствовать уничтожению Т-клетками раковых клеток. При ингибировании белков контрольных точек «тормоза» иммунной системы отпускаются и улучшается способность Т-клеток уничтожать раковые клетки. Примеры белков контрольных точек, присутствующих на Т-клетках или раковых клетках, включают PD-1/PD-L1 и CTLA-4/B7-1/B7-2, CD86, GITR, LAG3, VISTA, TIGIT и CD137L. Примеры ингибиторов контрольных точек включают, не ограничиваясь перечисленным, ипилимуаб (Yervoy®), пембролизумаб (KEYTRUDA®) и ниволумаб (OPDIVO®), атезолизумаб (TECENTRIQ®), авелумаб (BAVENCIO®), дурвалумаб (IMFINZI®).

[0103] «ГКГС» или «главный комплекс гистосовместимости» представляет собой группу генов, кодирующих белки, находящиеся на поверхностях клеток, которые помогают иммунной системе распознавать чужеродные вещества. Белки ГКГС обнаружены у всех высших позвоночных. Существует два главных типа молекул ГКГС: ГКГС I класса и ГКГС II класса. У людей существует три различных генетических локуса, кодирующих молекулы ГКГС I класса (молекулы ГКГС человека также называются человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA)): HLA-A, HLA-B и HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 и HLA-A*11 являются примерами различных аллелей ГКГС I класса, которые могут быть экспрессированы из этих локусов.

[0104] Предполагается, что один или более членов списка, предложенного в настоящей заявке, могут быть специально исключены из заявленного изобретения или включены в него.

[0105] Способы получения VLP известны в данной области техники, см., например, патент США № 9,149,503 и патент США № 9,580,474, включенные в настоящую заявку посредством ссылки. Один из аспектов изобретения относится к способу получения химерной VLP (или ее полипептидного компонента) согласно изобретению. В одном из аспектов изобретения Т-клеточные эпитопы синтезируют с использованием общепринятых способов, модифицированных для конкретных аминокислотных последовательностей. Такие методы включают, например, способы, хорошо известные специалистам в области пептидного синтеза, например, синтез в жидкой фазе (см. Finn et al. в источнике *Proteins*, 3rd Ed., Neurath and Hill (Eds), Academic Press, NY, 2, 105-253, 1976), или твердофазный синтез (см. Barany et al. в источнике *The Peptides*, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 3-284, 1979), или постадийный твердофазный синтез, описанный Merrifield et al. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154), содержание каждого из которых включено в настоящую заявку посредством ссылки. Другие ссылки на методы синтеза пептидов включают пептиды, синтезированные Fmoc-полиамидным методом твердофазного пептидного синтеза, как раскрыто Lu et al. (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433, пептиды, синтезированные с использованием процедуры Fmoc/tBu (Atherton et al. в источнике *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989). Fmoc-аминокислоты могут быть получены от различных поставщиков, например, Chem-Impex International (Вуд Дейл, Иллинойс, США), Merck Biosciences (Ноттингем, Великобритания) и Bachem UK Ltd. (Сент-Хеленс, Великобритания). Синтезированный пептид может быть присоединен к VLP с использованием способов, известных в данной области техники. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ получения химерной VLP, описанный в настоящей заявке, включает сборку VLP из белка L1 вируса папилломы способами, известными в данной области техники, подвергание VLP восстанавливающим условиям, достаточным для восстановления VLP при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгирование целевого пептида с VLP с образованием химерной VLP. Целевой пептид может быть конъюгирован с восстановленной или активированной VLP посредством дисульфидной, малеимидной или амидной связи. Например, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения целевой пептид конъюгирован с сульфгидрильной группой цистеина либо на белке L1 или L2, либо на обоих белках L1 и L2 химерной VLP посредством дисульфидной связи или малеимидной связи. Целевой

пептид может быть конъюгирован с сульфгидрильными группами цистеина либо на белке L1 или L2, либо на обоих белках L1 и L2 химерной VLP посредством дисульфидной связи или малеимидной связи. Восстановленные цистеины могут находиться на поверхности VLP. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения белки L1 или L2 VLP могут содержать в среднем один целевой пептид, два целевого пептида, три целевого пептида, четыре целевого пептида или пять целевых пептидов на белок L1 или L2. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения с каждым из белка L1 или L2 химерной VLP конъюгировано в среднем от трех до пяти целевых пептидов. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 30% поверхностных цистеинов VLP содержат целевой пептид. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения около 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % или 100 % поверхностных цистеинов VLP содержат целевой пептид. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения около 30-50 % поверхностных цистеинов VLP содержат целевой пептид.

[0106] В одном из вариантов осуществления изобретения целевой пептид может быть конъюгирован с лизином или аргинином либо на белке L1 или L2, либо на обоих белках L1 и L2 химерной VLP посредством амидной связи. Лизины и/или аргинины, конъюгированные с целевым пептидом, могут находиться на поверхности VLP. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 30 % поверхностных лизинов и/или поверхностных аргининов VLP содержат целевой пептид. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения около 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % или 100 % поверхностных лизинов и/или поверхностных аргининов VLP содержат целевой пептид. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения около 30-50 % поверхностных лизинов и/или поверхностных аргининов VLP содержат целевой пептид.

[0107] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения около 30-50% поверхностных лизинов и поверхностных цистеинов VLP конъюгированы с целевым пептидом. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 30 % поверхностных лизинов и/или поверхностных цистеинов VLP конъюгированы с целевым пептидом. В одном из аспектов настоящего изобретения поверхностные цистеины и поверхностные лизины конъюгированы с целевым пептидом таким образом, что около 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % поверхностных цистеинов и лизинов конъюгированы с целевым пептидом. Лизины и цистеины могут быть конъюгированы с целевыми пептидами, имеющими один и тот же CD8+ T-клеточный эпитоп, или с целевыми пептидами, имеющими разные CD8+

Т-клеточные эпитопы, таким образом, что VLP конъюгирована с несколькими целевыми пептидами, имеющими разные CD8⁺ Т-клеточные эпитопы.

[0108] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения около 30-50 % поверхностных аргининов и поверхностных цистеинов VLP конъюгированы с целевым пептидом. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 30 % поверхностных аргининов и/или поверхностных аргининов VLP конъюгированы с целевым пептидом. В одном из аспектов настоящего изобретения поверхностные цистеины и поверхностные аргинины конъюгированы с целевым пептидом таким образом, что около 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % или 100 % поверхностных цистеинов и поверхностных аргининов конъюгированы с целевым пептидом. Аргинины и цистеины могут быть конъюгированы с целевыми пептидами, имеющими один и тот же CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, или с целевыми пептидами, имеющими разные CD8⁺ Т-клеточные эпитопы, таким образом, что VLP конъюгирована с несколькими целевыми пептидами, имеющими разные CD8⁺ Т-клеточные эпитопы.

[0109] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения все целевые пептиды, конъюгированные с VLP, содержат один и тот же CD8⁺ Т-клеточный эпитоп. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения VLP конъюгирована с несколькими целевыми пептидами, где целевые пептиды содержат разные CD8⁺ Т-клеточные эпитопы. CD8⁺ Т-клеточные эпитопы могут принадлежать одному и тому же патогену или разным патогенам.

[0110] Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к композиции, содержащей популяцию химерных VLP, описанных в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Популяция химерных VLP может представлять собой популяцию одинаковых химерных VLP или популяцию разных химерных VLP.

[0111] В качестве альтернативы, полипептид, например, целевой пептид, и белок L1 или L2 согласно изобретению, могут быть получены рекомбинантно. В настоящем изобретении предложены рекомбинантные векторы клонирования и экспрессии, содержащие ДНК, а также клетка-хозяин, содержащая рекомбинантные векторы. Векторы экспрессии, содержащие ДНК, могут быть использованы для получения полипептидов, например, целевых пептидов и белков L1 и L2, кодируемых ДНК. Способ получения полипептидов включает культивирование клеток-хозяев, трансформированных рекомбинантным вектором экспрессии, кодирующим полипептид, в условиях, способствующих экспрессии полипептида, с последующим выделением

экспрессированных полипептидов из культуры. Специалисту будет ясно, что процедура очистки экспрессированных полипептидов будет различаться в зависимости от таких факторов, как тип используемых клеток-хозяев, и от того, является ли полипептид мембранносвязанной или растворимой формой, которая секретируется из клетки-хозяина. Полипептиды согласно изобретению могут включать различные лидерные последовательности, управляющие транспортом или способствующие очистке.

[0112] Может быть использована любая подходящая система экспрессии. Векторы включают ДНК, кодирующую полипептид, например, целевой пептид, белок L1 или L2, или полипептиды, содержащие белок L1 или L2 и целевой пептид согласно изобретению, функционально связанные с подходящими регуляторными нуклеотидными последовательностями транскрипции или трансляции, такими как последовательности, полученные от гена млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Примеры регуляторных последовательностей включают транскрипционные промоторы, операторы или энхансеры, сайт связывания рибосомы мРНК и подходящие последовательности, контролирующие инициацию и терминацию транскрипции и трансляции. Нуклеотидные последовательности функционально связаны, когда регуляторная последовательность находится в функциональном отношении с последовательностью ДНК. Таким образом, нуклеотидная последовательность промотора функционально связана с последовательностью ДНК, если нуклеотидная последовательность промотора контролирует транскрипцию последовательности ДНК. В вектор экспрессии обычно включают точку начала репликации, обеспечивающую способность к репликации в желаемых клетках-хозяевах, и селективируемый ген, по которому идентифицируют трансформанты.

[0113] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии полипептидов включают прокариот, дрожжи или высшие эукариотические клетки. Клетки млекопитающих или насекомых пригодны для использования в качестве клеток-хозяев. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для использования с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны, например, Pouwels et al в источнике Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985. Также могут быть использованы бесклеточные системы трансляции для получения полипептидов с использованием РНК, полученных из конструкций ДНК, раскрытых в настоящей заявке. В целом методы молекулярной биологии, упомянутые в настоящей заявке, хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в источниках Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, текущее издание, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & sons, New York, N.Y.

[0114] Способы, обеспечивающие сборку полипептидов в VLP, хорошо известны и общеприняты, как и способы их очистки для применения у субъектов. Подходящие условия для самосборки описаны, например, в способах, описанных в примерах, приведенных в настоящей заявке, или в источниках Kirnbauer et al. (1993) *J Virol* 67, 6929-6936; Volpers et al. (1994) *Virology* 200, 504-512; или Chen et al., *J Mol Biol* 2001 Mar. 16; 307(1):173-82, все из которых включены посредством ссылки на описания таких способов.

[0115] Способы согласно настоящему изобретению включают лечение существующих опухолей эффективным количеством химерных VLP согласно изобретению. Способы согласно настоящему изобретению включают введение химерных VLP согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту в количестве, достаточном для ингибирования роста, прогрессирования или метастазирования опухоли. В одном из вариантов осуществления способов согласно настоящему изобретению химерную VLP вводят нуждающемуся в этом субъекту в количестве, достаточном для стимуляции выработки цитокинов и/или клеточного иммунитета, в частности, врожденного иммунитета, включая стимуляцию цитотоксической активности макрофагов и естественных киллеров. В некоторых аспектах настоящего изобретения нуждающийся в этом субъект представляет собой субъекта, который ранее получал лечение от опухоли и в настоящее время считается не имеющим рака или не имеющим заболеваний в соответствии с медицинскими стандартами.

[0116] Один из аспектов изобретения относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта путем введения указанному субъекту химерной VLP согласно настоящему изобретению, где эпитоп CD8⁺ целевого пептида принадлежит патогену, обладающему тропизмом к ткани, являющейся источником рака («исходная ткань»). Указанный способ включает определение исходной ткани, определение, был ли субъект активно вакцинирован против патогена, обладающего тропизмом к исходной ткани, или инфицирован им, и затем введение субъекту эффективного количества химерной VLP согласно настоящему изобретению, где эпитоп CD8⁺ целевого пептида принадлежит антигенной детерминанте, содержащейся в вакцине, ранее введенной субъекту, или патогену, которым субъект был инфицирован.

[0117] В данной области техники известно, что некоторые вирусы проявляют тропизм к конкретному типу ткани. Например, вирусы, проявляющие тропизм к ткани головного мозга, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус JC, корь, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCM), арбовирус и бешенство; вирусы, проявляющие тропизм к ткани глаза, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус простого герпеса, аденовирус и цитомегаловирус; вирусы, проявляющие тропизм к назальной

ткани, включают, не ограничиваясь перечисленным, риновирусы, вирусы парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус; вирусы, проявляющие тропизм к ткани полости рта, например, слизистой оболочке полости рта, десне, слюнным железам, глотке, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус простого герпеса I типа и II типа, вирус эпидемического паротита, вирус Эпштейна-Барр и цитомегаловирус; вирусы, проявляющие тропизм к легочной ткани, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус гриппа типа А и типа В, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирус и коронавирус, связанный с SARS (тяжелым острым респираторным синдромом); вирусы, проявляющие тропизм к нервной ткани, например, спинному мозгу, включают, не ограничиваясь перечисленным, полиовирус и Т-лимфотропный вирус человека 1 типа; вирусы, проявляющие тропизм к сердечной ткани, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус Коксаки В; вирусы, проявляющие тропизм к ткани печени, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирусы гепатита типов А, В и С; вирусы, проявляющие тропизм к ткани желудочно-кишечного тракта, например, желудку и толстому и тонкому кишечнику, включают, не ограничиваясь перечисленным, аденовирус, ротавирус, норовирус, астровирус и коронавирус; вирусы, проявляющие тропизм к ткани поджелудочной железы, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус Коксаки В; вирусы, проявляющие тропизм к ткани кожи, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса 6 типа, вирус натуральной оспы, вирус контагиозного моллюска, вирусы папилломы, парвовирус В19, краснуху, корь и вирус Коксаки А; и вирусы, проявляющие тропизм к ткани половых органов, включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус простого герпеса 2 типа, папилломавирусы, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).

[0118] Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу лечения рака легкого, включающему определение, был ли субъект активно вакцинирован против патогена, инфицирующего клетки легкого, например, вируса гриппа, например вируса гриппа типа А или типа В, с последующим введением эффективного количества химерной VLP согласно настоящему изобретению, где CD8⁺ Т-клеточный эпитоп целевого пептида принадлежит антигенным детерминантам патогена, содержащегося в вакцине, и этот Т-клеточный эпитоп образует комплекс с молекулой ГКГС I класса указанного субъекта. В одном из аспектов способ лечения рака легкого согласно настоящему изобретению включает определение, был ли субъект инфицирован патогеном, инфицирующим клетки легкого, например, вирусом гриппа, например вирусом гриппа типа А или типа В, с последующим введением эффективного количества химерной VLP согласно настоящему изобретению, где CD8⁺ Т-клеточный эпитоп целевого пептида принадлежит этому

патогену, и этот Т-клеточный эпитоп образует комплекс с молекулой ГКГС I класса указанного субъекта.

[0119] Один из аспектов изобретения относится к способу лечения рака полости рта, который является частью группы раковых заболеваний, обычно называемых раковыми заболеваниями головы и шеи, путем введения химерной VLP согласно настоящему изобретению, где эпитоп CD8⁺ целевого пептида принадлежит патогену, обладающему тропизмом к ткани полости рта, например, вирусу эпидемического паротита, вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу или вирусу простого герпеса 1 типа. Способ включает определение, был ли нуждающийся в этом субъект активно вакцинирован против, например, вируса эпидемического паротита, вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса или вируса простого герпеса 1 типа, или инфицирован им, и если указанный субъект был ранее вакцинирован или инфицирован – введение субъекту химерной VLP согласно настоящему изобретению, где эпитоп CD8⁺ целевого пептида принадлежит вирусу эпидемического паротита или вирусу кори, или антигенному компоненту вакцины, которую получил указанный субъект, или патогену, т. е., эпидемическому паротиту, кори, вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу или вирусу простого герпеса 1 типа, которым указанный субъект был ранее инфицирован.

[0120] Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу стимуляции цитотоксической активности макрофагов и естественных киллеров путем введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества химерной VLP согласно настоящему изобретению. Макрофаги и естественные киллеры могут представлять собой макрофагов и естественных киллеров, присутствующих в микроокружении опухоли. В одном из аспектов настоящего изобретения химерные VLP вводят субъекту в количестве, эффективном для стимуляции цитотоксической активности макрофагов и естественных киллеров, уже присутствующих в микроокружении опухоли. В одном из аспектов настоящего изобретения химерные VLP вводят субъекту в количестве, эффективном для привлечения макрофагов и естественных киллеров в микроокружение опухоли.

[0121] В одном из аспектов настоящего изобретения химерные VLP вводят субъекту в количестве, эффективном для связывания достаточного количества антител с целевым пептидом для привлечения и стимуляции макрофагов, нейтрофилов и естественных киллеров.

[0122] Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу перенаправления цитотоксической активности существующей CD8⁺ Т-клетки памяти на опухолевую клетку или микроокружение опухоли путем введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества химерной VLP согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно, Т-клеточный эпитоп целевого пептида химерной VLP получен из патогена, против которого указанный субъект был активно вакцинирован, или из патогена, которым указанный субъект был ранее инфицирован, и у указанного субъекта имеются CD8⁺ Т-клетки памяти, распознающие Т-клеточный эпитоп в комплексе с молекулой ГКГС I класса на опухолевых клетках. В одном из аспектов настоящего изобретения эффективное количество химерной VLP представляет собой количество, достаточное для привлечения CD8⁺ Т-клеток памяти в микроокружение опухоли. В одном из аспектов настоящего изобретения эффективное количество химерной VLP представляет собой количество, достаточное для стимуляции CD8⁺ Т-клеток памяти, присутствующих в микроокружении опухоли.

[0123] Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу введения целевого пептида, как описано в настоящей заявке, в микроокружение опухоли путем введения нуждающемуся в этом субъекту химерной VLP согласно настоящему изобретению. В одном из аспектов настоящего изобретения CD8⁺ Т-клеточный эпитоп целевого пептида высвобождается из VLP в микроокружение опухоли в количестве, достаточном для стимуляции CD8⁺ Т-клеток памяти в этом микроокружении. В одном из аспектов настоящего изобретения химерная VLP и/или целевой пептид химерной VLP восприимчивы к расщеплению протеолитическим ферментом в микроокружении опухоли, и положение сайта-мишени для расщепления в химерной VLP или целевом пептиде таково, что в результате расщепления сайта-мишени весь или часть целевого пептида, содержащего CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, высвобождается из химерной VLP в микроокружение опухоли. В одном из аспектов настоящего изобретения сайт расщепления распознается фурином, матриксными металлопротеиназами (MMP), например, MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -11, -13, -14 или -19, ADAM (дезинтегрин и металлопротеиназа), например, ADAMS-8, -9, -10, -15, -17 или -28, катепсином, например, катепсином В, D, G или H, эластазой нейтрофилов, протеиназой-3, азуроцидином или ADAMTS-1. Специалист без труда может определить достаточные количества химерной VLP, и следует принимать во внимание, что количество будет зависеть, например, от особенностей субъекта, например, возраста, массы тела, пола, состояния здоровья субъекта, и особенностей опухоли, например, типа, объема и степени развития.

[0124] В одном из аспектов настоящего изобретения химерная VLP и/или целевой пептид химерной VLP восприимчивы к расщеплению протеолитическим ферментом в опухолевой клетке, и положение сайта-мишени для расщепления в VLP или целевом пептиде таково, что в результате расщепления сайта-мишени весь или часть целевого пептида, содержащего CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, высвобождается из химерной VLP, и

указанный эпитоп образует комплекс с молекулой ГКГС I класса опухолевой клетки. Специалист без труда может определить достаточные количества химерной VLP, и следует принимать во внимание, что количество будет зависеть, например, от особенностей субъекта, например, возраста, массы тела, пола, состояния здоровья субъекта, и особенностей опухоли, например, типа, объема и степени развития.

[0125] В одном из аспектов изобретения для выбора подходящей(их) химерной(их) VLP согласно настоящему изобретению для введения нуждающемуся в этом субъекту устанавливают, был ли субъект активно вакцинирован против данного патогена, например, паразита, бактерии или вируса, например, кори или полиомиелита, и затем выбирают и вводят субъекту химерную VLP согласно настоящему изобретению, где CD8+ Т-клеточный эпитоп целевого пептида получен из патогена, против которого субъект был иммунизирован. То, был ли субъект активно вакцинирован против конкретного патогена, можно установить, просмотрев медицинские записи пациента или опросив его. В одном из аспектов изобретения для выбора подходящей(их) химерной(их) VLP для введения нуждающемуся в этом субъекту устанавливают, был ли субъект ранее инфицирован данным патогеном, например, паразитом, бактерией или вирусом, например, кори или полиомиелита, и инфекция была излечена, и затем выбирают и вводят субъекту химерную VLP, где CD8+ Т-клеточный эпитоп целевого пептида представляет собой CD8+ Т-клеточный эпитоп, полученный из такого патогена. То, был ли субъект инфицирован конкретным патогеном, можно установить, просмотрев медицинские записи пациента или опросив его. Неограничивающие примеры CD8+ Т-клеточного эпитопа, связывающегося с конкретными молекулами ГКГС I класса, приведены в таблице 1 и таблице 2. Способ также может включать определение того, какую детерминанту(ы) ГКГС I класса экспрессируют клетки субъекта, и затем введение химерной VLP согласно настоящему изобретению, где CD8+ Т-клеточный эпитоп целевого пептида представляет собой CD8+ Т-клеточный эпитоп антигенного компонента патогена, содержащегося в вакцине, или патогена, которым субъект был ранее инфицирован, и указанный эпитоп образует комплекс с детерминантной(ами) ГКГС I класса субъекта.

[0126] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления химерные VLP, описанные в настоящей заявке, вводят в комбинации с другими видами противораковой терапии, например, радиационной терапией, химиотерапией, хирургическим вмешательством и/или иммунотерапией. В некоторых аспектах настоящего изобретения химерные VLP, описанные в настоящей заявке, вводят в комбинации с ингибиторами контрольных точек. Химерные VLP согласно настоящему изобретению и другие виды терапии или терапевтические агенты могут быть введены одновременно или

последовательно одним и тем же или разными способами введения. Определение терапевтического(их) агента(ов) и его количества для применения в способах согласно настоящему изобретению может быть без труда осуществлено обычными специалистами в области медицины с помощью стандартных методик, известных в данной области техники.

[0127] VLP имеют адъювантные свойства. В некоторых вариантах иммуногенность композиций, содержащих химерные VLP согласно настоящему изобретению, может быть повышена путем использования дополнительных неспецифических стимуляторов иммунного ответа, известных как адъюванты. Подходящие адъюванты включают все приемлемые иммуностимулирующие соединения, такие как цитокины, токсины или синтетические композиции, такие как квасцы.

[0128] Адъюванты включают, не ограничиваясь перечисленным, эмульсии масло-в-воде, эмульсии вода-в-масле, минеральные соли, полинуклеотиды и природные вещества. Конкретные адъюванты, которые могут быть использованы, включают ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, интерферон- γ , ГМ-КСФ, БЦЖ, соли алюминия, такие как гидроксид алюминия или другое соединение алюминия, соединения MDP, такие как thur-MDP и por-MDP, CGP (MTP-PE), липид А и монофосфорил-липид А (MPL), или инактивированные микробиологические агенты. RIBI, содержащий три компонента, выделенные из бактерий, MPL (монофосфориллипид), димиколат трегалозы (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS) в эмульсии 2% сквален/Твин 80. Могут быть использованы даже антигены ГКГС. Примеры других адъювантов или способов приведены в патентах США №№ 6,814,971, 5,084,269, 6,656,462, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки).

[0129] Различные способы достижения адъювантного эффекта для композиций, содержащих химерные VLP, включают применение агентов, таких как гидроксид алюминия или фосфат алюминия (квасцы), обычно используемых в виде около 0,05-0,1% раствора в натрий-фосфатном буфере, смешивание с синтетическими полимерами сахаров (CARBOPOL®), используемой в виде около 0,25% раствора, агрегацию белка в композиции путем термической обработки при температурах от около 70 °C до около 101 °C в течение от 30 секунд до 2 минут, соответственно. Для достижения адъювантного эффекта также может быть использована агрегация путем повторной активации обработанными пепсином (Fab) антителами к альбумину; смесь с бактериальными клетками (например, *S. parvum*), эндотоксинами или липополисахаридными компонентами грамотрицательных бактерий; эмульсия в физиологически приемлемых масляных носителях (например, моноолеате маннида (Aracel A)); или эмульсия с 20%

раствором перфторуглерода (FLUOSOL-DA®), используемая в качестве блочного заменителя. Типичным адъювантом является полный адъювант Фрейнда (содержащий убитую палочку Коха), неполный адъювант Фрейнда и гидроксид алюминия.

[0130] Специалисту ясно, какие различные адъюванты подходят для введения людям. К ним относятся, например, Alum-MPL в качестве адъюванта или сопоставимый состав, ASO4, который используется в одобренной вакцине против ВПЧ CERVARIX®, ASO3, ASO2, MF59, монтанид, адъюванты на основе сапонинов, такие как GPI-0100, адъюванты на основе CpG или имихимод. В некоторых вариантах осуществления изобретения адъювант физически связан с VLP или инкапсулирован VLP, а не просто смешан с ними.

[0131] Помимо адъювантов может быть желательным совместное введение модификаторов биологических реакций (BRM) для усиления иммунного ответа. Было показано, что BRM активируют Т-клеточный иммунитет или подавляют активность клеток-супрессоров. Такие BRM включают, не ограничиваясь перечисленным, циметидин (CIM; 1200 мг/сут) (Smith/Kline, PA); или низкодозированный циклофосфамид (CYP; 300 мг/м²) (Johnson/Mead, NJ), и цитокины, такие как интерферон-γ, ИЛ-2 или ИЛ-12, или гены, кодирующие белки, участвующие в функциях иммунных хелперов, такие как B-7. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти гены инкапсулированы VLP для облегчения их доставки субъекту.

[0132] Приготовление композиций, содержащих полипептидную или пептидную последовательность(и) в качестве активных ингредиентов, в целом хорошо известно в данной области техники, как проиллюстрировано в патентах США №№ 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; и 4,578,770, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки. Как правило, такие композиции готовят в виде препаратов для инъекций в виде жидких растворов или суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгирован. Активный иммуногенный ингредиент часто смешивают с эксципиентами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол или тому подобное, и их комбинации. Кроме того, при необходимости композиции могут содержать определенное количество вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для поддержания pH или адъюванты, усиливающие эффективность вакцин. В конкретных вариантах осуществления вакцины готовят из комбинации веществ, как описано в патентах США №№ 6,793,923 и 6,733,754,

включенных в настоящую заявку посредством ссылки.

[0133] Композиции, содержащие химерные VLP согласно настоящему изобретению, находятся в биологически совместимой форме, подходящей для введения субъектам *in vivo*. Фармацевтические композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный надзорным органом федерального правительства или правительства штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят VLP. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, включая, не ограничиваясь перечисленным, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. При пероральном введении фармацевтической композиции носителем может выступать вода. При внутривенном введении фармацевтической композиции носителями могут выступать физиологический раствор и водный раствор декстрозы. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина могут быть использованы в качестве жидких носителей для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Фармацевтическая композиция также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов, или буферных агентов для поддержания pH.

[0134] Фармацевтические композиции, содержащие химерные VLP согласно настоящему изобретению, могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и тому подобного. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической категории и т. д. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит эффективное количество химерной VLP согласно настоящему изобретению вместе с подходящим количеством фармацевтически приемлемого носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения.

[0135] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены любым конкретным способом введения, включая, не ограничиваясь

перечисленным, внутривенное, внутримышечное, внутрисуставное, внутрибронхиальное, интраабдоминальное, внутрикапсулярное, внутривещное, внутриполостное, внутрижелудочковое, внутримозжечковое, интрацеребровентрикулярное, в толстую кишку, интрацервикальное, внутрижелудочное, внутрипеченочное, интрамиокардиальное, внутрикостное, эндостальное, внутрилоханочное, внутриперикардиальное, внутрибрюшинное, внутриплевральное, внутрипростатическое, внутрилегочное, внутрипрямокишечное, внутрипочечное, интратетинальное, интраспинальное, интрасиновиальное, внутригрудное, внутриматочное, внутрипузырное, болюсное, пероральное, парентальное, подкожное, вагинальное, ректальное, буккальное, сублингвальное, интраназальное, средствами для ионофореза или средствами для чрескожного введения. Наиболее подходящими способами являются внутривенная инъекция или пероральное введение. В частных вариантах осуществления композиции вводят в целевой области или вблизи нее, например, путем внутриопухолевой инъекции.

[0136] Например, для парентерального введения в водном растворе указанный раствор при необходимости должен быть соответствующим образом забуферен, и жидкий разбавитель прежде всего должен быть сделан изотоническим с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Именно эти водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, внутриопухолевого, подкожного и внутрибрюшинного введения. В этой связи в свете настоящего описания специалистам в данной области техники известны стерильные водные среды, которые могут быть использованы. Например, одна дозировка может быть растворена в изотоническом растворе NaCl и либо добавлена в жидкость для гиподермоклизиса, либо введена с помощью инъекции в предложенное место инфузии (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990). В зависимости от состояния субъекта дозировка будет претерпевать некоторые изменения. Лицо, ответственное за введение, в любом случае должно определить подходящую дозу для отдельно взятого субъекта.

[0137] Химерные VLP-содержащие композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены путем ингаляции. В отдельных вариантах осуществления композиция может быть введена в виде аэрозоля. В контексте настоящей заявки термин «аэрозоль» или «аэрозольная композиция» относится к суспензии твердых или жидких частиц в газе. Эти термины в общем могут использоваться для обозначения композиции, которая была превращена в пар, распылена или иным образом превращена из твердой или жидкой формы во вдыхаемую форму, включающую суспендированные твердые или жидкие частицы лекарственного средства. Такие аэрозоли могут быть использованы для доставки композиции через дыхательную систему. В контексте настоящей заявки термин

«дыхательная система» относится к системе органов в организме, ответственной за потребление кислорода и выдыхание углекислого газа. Эта система обычно включает все дыхательные пути от носа до легочных альвеол. Обычно считают, что у млекопитающих она включает легкие, бронхи, бронхиолы, трахею, носовые ходы и диафрагму. В контексте настоящей заявки доставка композиции в дыхательную систему свидетельствует о том, что лекарственное средство доставляется в один или несколько дыхательных путей дыхательной системы, в частности, в легкие.

[0138] Дополнительные препараты, пригодные для других способов введения, включают суппозитории (для анального или вагинального применения) и, в некоторых случаях, пероральные составы. Для суппозиторий традиционные связующие вещества и носители могут включать, например, полиалкиленгликоли или триглицериды: такие суппозитории могут быть приготовлены из смесей, содержащих активный ингредиент в количестве от около 0,5 % до около 10 %, предпочтительно от около 1 % до около 2 %. Пероральные препараты включают такие обычно используемые эксципиенты, как, например, маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической категории и тому подобное. Эти композиции принимают форму растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, препаратов с замедленным высвобождением или порошков и содержат от около 10 % до около 95 % активного ингредиента, предпочтительно от около 25 % до около 70 %.

[0139] Композиции, содержащие химерные VLP, могут быть включены в состав вакцины в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные со свободными аминокруппами пептида) и соли, образованные с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или с органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и тому подобные. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и тому подобных.

[0140] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут включать эффективное количество дополнительного адъюванта. Как отмечено в настоящей заявке, VLP папилломавируса имеют адъювантные свойства. Подходящие дополнительные адъюванты включают, не ограничиваясь перечисленным, полный или неполный Фрейнда, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плуроновые многоатомные спирты,

полианионы, пептиды, масляные эмульсии, динитрофенол и потенциально пригодные адъюванты человеческих вакцин, такие как Бацилла Кальмета-Герена (БЦЖ), *Carynebacterium parvum* и нетоксичный холерный токсин.

[0141] При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во всех случаях фармацевтическая форма должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы ее можно было легко ввести путем инъекции. Она также должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

[0142] Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобное), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, а также применения поверхностно-активных веществ. Действие микроорганизмов может быть предотвращено за счет различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция композиций для инъекций может быть обеспечена применением в композициях агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0143] Стерильные растворы для инъекций получают путем включения химерных VLP в необходимом количестве в подходящий растворитель с различными ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный наполнитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются методики вакуумной сушки и лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента в комбинации с любым дополнительным желаемым ингредиентом из их раствора, предварительно стерилизованного фильтрацией.

[0144] Различные аспекты настоящего изобретения включают введение эффективного количества композиции, содержащей химерные VLP, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерную

VLP, содержащую целевой пептид, содержащий CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, вводят пациенту для лечения опухоли или предотвращения рецидива такой опухоли. Такие композиции обычно растворяют или диспергируют в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

[0145] В способах согласно настоящему изобретению опухоль может представлять собой мелкоклеточный рак легкого, гепатоклеточную карциному, рак печени, гепатоклеточную карциному, меланому, метастатическую меланому, рак надпочечника, рак анального канала, апластическую анемию, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак мозга/ЦНС, рак молочной железы, рак неизвестного первичного происхождения, болезнь Каслмана, рак шейки матки, рак толстой/прямой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, опухоли семейства саркомы Юинга, рак глаза, рак желчного пузыря, карциноидные опухоли желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО), гестационную трофобластическую болезнь, болезнь Ходжкина, саркому Капоши, рак почки, рак гортани и гипотарингеальный рак, лейкоз, рак печени, рак легкого, лимфому, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, рак полости рта и ротоглотки, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоли гипофиза, рак предстательной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема, опухоль Вильмса, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, лимфому Беркитта, лимфобластные лимфомы, мантийноклеточную лимфому (МКЛ), множественную миелому (ММ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), лимфому маргинальной зоны селезенки, лимфому маргинальной зоны (внеузловую или узловую), диффузные агрессивные лимфомы взрослых, смешанные по составу типов клеток, крупноклеточные диффузные агрессивные лимфомы взрослых, крупноклеточные иммунобластные диффузные агрессивные лимфомы взрослых, мелкоклеточные с нерасщепленными ядрами агрессивные лимфомы взрослых или фолликулярную лимфому, рак головы и шеи, карциному эндометрия или матки, немелкоклеточный рак легкого, остеосаркому, глиобластому или метастатический рак. В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак поджелудочной железы или меланому, например, меланому B16F10.

[0146] Соответственно, частные варианты осуществления способов согласно настоящему изобретению относятся к введению эффективных количеств композиций,

содержащих химерные VLP согласно настоящему изобретению. В контексте настоящей заявки термин «эффективный» означает достаточный для достижения желаемого, ожидаемого или предполагаемого результата. Более конкретно, «эффективное количество» относится к количеству композиции согласно настоящему изобретению (например, содержащей химерные VLP папилломавируса, содержащие целевой антиген), либо по отдельности, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом (например, VLP папилломавируса, содержащей нативный белок L1, химиотерапевтическим средством или ингибитором контрольных точек), необходимому для обеспечения желаемого терапевтического действия, например, количеству, эффективному для ингибирования роста, прогрессирования или метастазирования опухоли или для предотвращения, облегчения, лечения или ослабления симптомов заболевания, например, рака, или увеличения выживаемости субъекта, подлежащего лечению. Специалистам в данной области техники ясно, что точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту в зависимости от возраста, общего состояния субъекта, тяжести состояния, подлежащего лечению, конкретного вводимого соединения и/или композиции и тому подобного. Подходящее «терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» в любом отдельном случае может быть определено специалистом в данной области техники посредством отсылки на соответствующие тексты и литературные источники и/или посредством обычных экспериментов. Подразумевается, что ссылка на фармацевтическую композицию (например, вакцину), ее состав, введение и тому подобное может относиться, в зависимости от контекста, к химерной VLP папилломавируса, содержащей целевой пептид, VLP папилломавируса, содержащей нативный белок L1, или их смесям, включая смеси химерных VLP, содержащих разные целевые пептиды. Термин «разовая доза» или «дозировка» относится к физически дискретным единицам, подходящим для применения у субъекта, каждая из которых содержит заданное количество композиции, рассчитанное для получения желаемых ответов, обсуждаемых выше в связи с ее введением, т. е. подходящим способом и режимом. Количество, подлежащее введению, на основании как количества введений, так и разовой дозы, зависит от желаемого результата.

[0147] Введение композиций согласно настоящему изобретению обычно осуществляется любым общепринятым способом. Такие способы включают, не ограничиваясь перечисленным, внутривенное, внутрикожное, внутриопухолевое, подкожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, респираторное, назальное, пероральное/прием внутрь, буккальное, сублингвальное или ортотопическое введение. В отдельных вариантах осуществления композиция, содержащая VLP, может быть

ингалирована (например, патент США 6,651,655, специально включенный посредством ссылки). Композиции, содержащие химерные VLP согласно настоящему изобретению, также могут быть введены непосредственно в опухоль или вблизи опухоли, так что VLP вводятся в микроокружение опухоли. Такие композиции обычно вводят в виде фармацевтически приемлемых композиций, включающих физиологически приемлемые носители, буферы или другие эксципиенты. Дозировка композиции будет зависеть от способа введения и будет варьироваться в зависимости, например, от размера и состояния здоровья субъекта, и тяжести состояния.

[0148] В целом, композиции, содержащие химерные VLP согласно настоящему изобретению, могут быть использованы по отдельности или совместно с другими терапевтическими агентами в подходящих дозировках, определенных обычным тестированием, для достижения оптимальной эффективности при минимизации любой потенциальной токсичности. Другие терапевтические агенты включают, например, не ограничиваясь перечисленным, химиотерапевтические агенты и ингибиторы контрольных точек. Режим дозирования фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может быть выбран с учетом различных факторов, включая тип, биологический вид, возраст, массу тела, пол, медицинское состояние пациента; тяжесть состояния, подлежащего лечению; предполагаемую цель лечения (облегчение симптомов или излечение); способ введения; функцию почек и печени пациента; и конкретную применяемую фармацевтическую композицию, а также активность, стабильность и токсичность конкретной композиции. Врач, имеющий обычные навыки в данной области, может без труда определить и назначить эффективное количество фармацевтической композиции (и, возможно, других агентов, включая терапевтические агенты), необходимое для предотвращения, противодействия или остановки развития состояния, например, опухоли/рака.

[0149] Для оптимальной точности в достижении концентраций режима лечения в пределах диапазона, обеспечивающего максимальную эффективность с минимальной токсичностью, может потребоваться режим, основанный на кинетике доступности фармацевтической композиции для одного или более целевых сайтов. Распределение, равновесное состояние и выведение фармацевтической композиции могут быть приняты во внимание при определении оптимальной концентрации для режима лечения. Дозировки фармацевтической композиции, раскрытой в настоящей заявке, могут быть скорректированы при применении в комбинации для достижения желаемых действий. С другой стороны, дозировки фармацевтической композиции и различных терапевтических агентов могут быть оптимизированы независимо друг от друга и объединены для

достижения синергетического результата, при котором патология снижается больше, чем если бы они использовались по отдельности.

[0150] В частности, токсичность и терапевтическую эффективность фармацевтической композиции можно определить стандартными фармацевтическими методиками на клеточных культурах или подопытных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, смертельной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Соотношение дозы между токсическим и терапевтическим действием представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Фармацевтические композиции, демонстрирующие большие терапевтические индексы, являются предпочтительными, за исключением случаев, когда цитотоксичность композиции является желаемой активностью или терапевтическим результатом. Хотя могут быть использованы фармацевтические композиции, оказывающие токсические побочные действия, система доставки может нацеливать такие композиции на сайт пораженной ткани, чтобы минимизировать потенциальное повреждение неинфицированных клеток и, таким образом, уменьшить побочные действия. Как правило, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены таким образом, чтобы максимизировать эффективность и минимизировать токсичность.

[0151] Во многих случаях желательно осуществить несколько введений композиции, содержащей VLP, обычно не более, по меньшей мере или в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более вакцинаций, включая все диапазоны между ними. Вакцинации обычно проводят с интервалами от 1, 2, 3, 4, 5, 6 до 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, до 12 недель/месяцев/лет, включая все значения и диапазоны между ними, чаще с интервалами от трех до пяти недель.

[0152] Данные, полученные при анализе клеточных культур или исследованиях на животных, могут быть использованы при определении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировки таких композиций предпочтительно лежат в диапазоне циркулирующих концентраций, включающих ED₅₀ с низкой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой дозированной формы и используемого способа введения. Для любой композиции, используемой в способах согласно изобретению, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена из анализов клеточных культур. На животных моделях может быть определена доза, обеспечивающая диапазон циркулирующих концентраций в плазме, включающий значение IC₅₀ (концентрацию исследуемой композиции, обеспечивающую полумаксимальное подавление симптомов), определенное на клеточной

культуре. Эта информация может быть использована для более точного определения подходящих доз для человека. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0153] После приготовления растворы вводят способом, совместимым с дозированной формой и в количестве, являющемся терапевтически или профилактически эффективным. Препараты легко вводятся в различных дозированных формах, например, в виде растворов для инъекций, описанных в настоящей заявке.

[0154] Еще один аспект изобретения относится к набору для лечения согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления набор содержит флакон и, необязательно, вкладыш в упаковку с инструкциями по введению, причем флакон содержит композицию, содержащую химерные VLP, для введения в соответствии со способами согласно настоящему изобретению.

[0155] В набор может быть включена любая из композиций, описанных в настоящей заявке. В неограничивающем примере в набор могут быть включены реагенты для получения VLP и/или введения VLP, путем вакцинации посредством VLP. Набор может дополнительно включать реагенты для оценки активности VLP как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, наборы будут содержать композицию, содержащую VLP, в подходящем контейнере. В отдельных аспектах набор может включать реагенты и/или устройства для введения, например, шприц, ингалятор или распылитель. Он также может включать один или более буферов, соединений или устройств для приготовления композиции для введения.

[0156] Компоненты наборов могут быть упакованы либо в водной среде, либо в лиофилизированной форме. Емкости из наборов обычно включают по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другую емкость, в которую может быть помещен компонент, и предпочтительно соответствующим образом разделены на аликвоты. Если в наборе содержится более одного компонента, набор также обычно содержит второй, третий или другой дополнительный контейнер, в который могут быть по отдельности помещены дополнительные компоненты. Однако во флаконе могут содержаться различные комбинации компонентов. Наборы согласно настоящему изобретению также, как правило, будут включать средства для удержания контейнеров в защитной упаковке для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные методом литья под давлением или выдувного формования, в которых хранятся желаемые флаконы.

[0157] Когда компоненты набора представлены в одном и/или более жидких растворах, жидкий раствор представляет собой водный раствор, причем стерильный

водный раствор является особенно предпочтительным. Однако компоненты набора могут быть представлены в виде сухого(их) порошка(ов). Когда реагенты и/или компоненты представлены в виде сухого порошка, порошок может быть восстановлен путем добавления подходящего растворителя. Предполагается, что растворитель также может быть предоставлен в другом контейнере. Набор также может включать инструкции по использованию компонентов набора, а также по использованию любого другого реагента, не включенного в набор. Инструкции могут включать варианты осуществления. Предполагается, что такие реагенты являются вариантами осуществления наборов согласно изобретению.

[0158] Такие наборы, однако, не ограничиваются конкретными позициями, указанными выше, и могут включать любой реагент, используемый для приготовления и/или введения композиции, содержащей химерные VLP согласно изобретению.

[0159] Среди прочих применений наборы согласно изобретению могут быть использованы в экспериментах. Специалист сможет понять, какие компоненты наборов подходят для осуществления способа согласно изобретению.

[0160] Следующие примеры предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Предполагается, что без отклонения от сущности изобретения могут быть сделаны различные модификации, которые будут без труда понятны специалисту.

ПРИМЕРЫ

Пример I. Получение VLP

[0161] А. Бакуловирусную экспрессию белков L1 ВПЧ и получение частиц VLP ВПЧ (VLP) осуществляют способами, известными в данной области техники. Вкратце, частицы ВПЧ получают в клетках насекомых из рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего основной капсидный белок L1 папилломавируса. Клетки *Trichoplusia ni* (High FiveTM) или *Spodoptera frugiperda* (клетки SF9) инфицируют рекомбинантным бакуловирусом с высоким титром в среде Express Five или SF900-III в бессывороточных условиях. Через 96 ч инкубации при 27 °C клетки собирают и повторно суспендируют клеточную массу в экстракционном буфере (20 mM фосфатный буфер, pH 6,5, 0,5 M NaCl, 10 mM MgCl₂), содержащем ингибиторы протеазы. Частицы высвобождают методом замораживания-оттаивания. Нуклеиновые кислоты расщепляют путем инкубации в присутствии нуклеазы, активной в присутствии высокой концентрации солей. Лизат осветляют центрифугированием при 8000×g в течение 30 минут и делипидируют экстракцией Vertrel. Осветленный лизат загружают на подушку из 40% сахарозы и центрифугируют в роторе SW-28 при 27000 об/мин в течение 90 минут при 4 °C. Осадок повторно суспендируют в 20 mM фосфатном буфере, pH 6,5, 1 M NaCl, 10 mM DTT и

0,03% Твин 80, и хранят при 4 °С. Чистоту препарата наночастиц определяют с помощью SDS-PAGE, а морфологию частиц – с помощью электронной микроскопии (ЭМ). Типичные препараты имеют чистоту более 90 % и по данным ЭМ выглядят как полностью собранные капсидоподобные частицы размером 50 нм.

[0162] Частицы ВПЧ также получают в клетках млекопитающих способами, известными в данной области техники. Вкратце, оптимизированные по кодонам гены только капсидного L1 или капсидных L1 и L2 папилломавируса совместно трансфицируют в клетки 293ТТ (эмбриональные почечные клетки человека, трансфицированные большим Т-антигеном SV40 (Pastrana et al., 2004)). Клетки, совместно трансфицированные вектором экспрессии L1 и/или L1/L2, выдерживают в течение 24 часов и затем собирают. Вкратце, частицы ВПЧ высвобождают из клеток 293ТТ путем лизиса с помощью детергента. Клеточный лизат инкубируют в течение ночи при 37 °С. Зрелые частицы ВПЧ солюбилизируют путем добавления к лизату хлорида натрия и осветляют лизат низкоскоростным центрифугированием. Капсиды отделяют от клеточного детрита и детергента экстракцией высококонцентрированным раствором соли с последующим ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте Optiprep (йодиксанол) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту препарата определяют с помощью SDS-PAGE, а морфологию частиц – с помощью электронной микроскопии (ЭМ). Типичные препараты имеют чистоту более 90 % и по данным ЭМ выглядят как полностью собранные капсидоподобные частицы размером 50 нм.

[0163] Частицы ВПЧ также получают путем трансфекции генов только капсидного L1 или капсидных L1 и L2 папилломавируса в клетки 293EXPI. Клетки, совместно трансфицированные вектором экспрессии L1 и/или L1/L2, выдерживают в течение 72 часов и затем собирают. Частицы ВПЧ высвобождают из клеток 293EXPI путем лизиса с помощью детергента и инкубируют лизат в течение ночи при 37 °С с мягким детергентом (например, Brij58 или Triton X-100). Частицы в инкубированном в течение ночи лизате затем солюбилизируют добавлением хлорида натрия. Затем лизат осветляют низкоскоростным центрифугированием. Капсиды отделяют от клеточного детрита и детергента экстракцией высококонцентрированным раствором соли с последующим ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте Optiprep (йодиксанол) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту препарата наночастиц определяют с помощью SDS-PAGE, а морфологию частиц – с помощью электронной микроскопии (ЭМ). Типичные препараты имеют чистоту более 90 % и по данным ЭМ выглядят как полностью собранные капсидоподобные частицы размером 50 нм.

[0164] В. Присоединение целевого пептида к VLP ВПЧ

[0165] Химерные VLP, содержащие целевые пептиды, содержащие концевой цистеин, один из CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, имеющих последовательность FMYSDFHFI (SEQ ID NO: 136) (грипп), или GILGFVFTL SEQ ID NO: 119 (грипп), или KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6) (корь), или FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69) (гепатит В), или SLPRSRTPI (SEQ ID NO: 218) (вирус ветряной оспы), или SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219) (вирус ветряной оспы), и сайт ферментативного расщепления (например, RRRR или RVKR) между цистеином и Т-клеточным эпитопом (например, C – RRRR - эпитоп), получают путем конъюгирования целевых пептидов с VLP ВПЧ-16(К)-L1 из примера 1.А посредством конъюгации малеимидом. Вкратце, VLP ВПЧ в 50 mM NaHCO₃, pH 8,4 при концентрации белка L1 14 mM смешивают с коммерчески доступным гетеробифункциональным сшивающим агентом 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилатом (sSMCC) (Pierce Endogen, Рокфорд, Иллинойс) до конечного соотношения sSMCC/белок L1 (мол./мол.), равного около 100. Реакция протекает в течение 1 часа при 2–8 °С, и затем реакционную среду обессоливают путем диализа с буфером с pH 6,2, содержащим 10 mM гистидина, 0,5 M NaCl, 0,015% полисорбата 80, с получением VLP ВПЧ, активированных sSMCC. Эквиваленты малеимида определяют с помощью анализа DTNB (см. Fan et al., Vaccine (2004) Vol. 22: 2993-3003; Ionescu et al. J. Pharmaceutical Sciences, Vol. 95(1): 70-79 (Jan. 2006)). Целевые пептиды растворяют в барботируемом N₂ буфере, и каждый из них смешивают с активированными sSMCC VLP ВПЧ до соотношения тио/малеимид (мол./мол.), равного около 3. Реакция протекает в течение около 15 часов при 2–8 °С. Затем оба образца обрабатывают β-меркаптоэтанолом, чтобы погасить любой избыток малеимида. Наконец, образцы подвергают диализу (Dispodialyser MWCO 300000 Spectrum Industries Inc., Ранчо Домингес, Калифорния) с 0,5 M NaCl и 0,015% полисорбата 80.

Пример 2. Индукция цитокинов BMDC и макрофагами с помощью VLP

[0166] Химерные VLP ВПЧ (20 мкг) из примера 1, содержащие целевые пептиды, или VLP ВПЧ (20 мкг) без целевого пептида, или натрий-фосфатный буфер (PBS, 20 мкл) добавляют в *in vitro* культуры дендритных клеток, происходящих из костного мозга (BMDC, 10⁶ клеток/лунка), и первичных макрофагов. BMDC и макрофаги получены от мышей C57BL6. Через 24 часа культивирования при 37 °С супернатанты собирают из клеточных культур и количественно определяют профили цитокинов с использованием анализа на мышинные цитокины 32plex luminex.

[0167] Результаты: BMDC и макрофаги, подвергшиеся воздействию VLP с целевыми пептидами или без них, вырабатывают повышенные уровни провоспалительных цитокинов *in vitro* по сравнению с контрольными BMDC и макрофагами, подвергшимися

воздействию только PBS.

Пример 3. Индукция выработки цитокинов BMDC, совместно культивированными с Т-клетками, с помощью VLP

[0168] BMDC культивируют в течение 48 ч при 37 °C совместно с высокоочищенными сингенными Т-клетками (соотношение 1:1) в присутствии химерных VLP, содержащих целевые пептиды, полученные, как описано в примере 1 выше (10 мкг/мл), VLP ВПЧ-16(К)-L1 (10 мкг/мл) или rIFN- γ (рекомбинантного IFN- γ , 1000 Ед/мл). В качестве контролей BMDC культивируют только в среде или культивируют в присутствии химерных VLP из примера 1 (10 мкг/мл), VLP ВПЧ-16(К)-L1 (10 мкг/мл) или rIFN- γ в отсутствие Т-клеток. Каждое условие культивирования используют по меньшей мере в двух параллельных экспериментах. Выработку р70 ИЛ-12 определяют для каждого условия культивирования с использованием стандартных методик.

Пример 4. VLP связывают опухолевые клетки *in vivo*

[0169] А. Метод: мышам с опухолями яичника SHIN-3 DSR или без них с помощью внутрибрюшинной инъекции вводят 1×10^8 ME псевдовируса (PsV) ВПЧ-16-Luc (люцифераза) (полученного, как описано в Buck et al. Journal of Virology, (2004), 78:751-757 или в Hung et al. PLoS One (2012); 7(7):e40983, включенных в настоящую заявку посредством ссылки) в 100 мкл PBS или PBS с 1% йота-каррагинаном (каррагинан ингибирует связывание HPV с клетками). Через сорок восемь часов вводят субстрат люциферин и измеряют биолюминесценцию. В районе брюшной полости очерчивают исследуемую область и вычисляют среднюю интенсивность излучения. Все данные относятся к $n = 5$ /группа.

[0170] Результаты: PsV ВПЧ-16-Luc связывается с опухолями яичника SHIN-3 DSR *in vivo*.

[0171] В. Метод: опухоли яичника человека, перевитые только от животных с иммунодефицитом, подкожно имплантируют мышам. Когда опухоли имеют диаметр от 7 до 15 мм, животные получают внутриопухолевую инъекцию 50 мкл PBS или 50 мкл PsV ВПЧ-16-Luc (приблизительно 1 мкг/мкл). Животные без опухолей получают подкожную инъекцию 50 мкл PBS или 50 мкл PsV ВПЧ-16-Luc (приблизительно 1 мкг/мкл) в заднюю боковую часть. Люминесцентные изображения регистрируют на следующий день после инъекции PsV ВПЧ-16/Luc. Для получения люминесцентного изображения используют время накопления сигнала 2 мин. Значения люминесценции представлены как средняя интенсивность излучения.

[0172] Результаты: PsV ВПЧ-16-Luc связывают и инфицируют приживленные ксенотрансплантаты опухолей яичника человека, но не здоровые ткани, *in vivo*.

Пример 5. Иммуномодуляция микроокружения опухоли с помощью VLP

[0173] Метод: в каждый из дней с 1 по 8 100 мкг VLP ВПЧ из примера 1 с целевым пептидом или без него вводят мышам с опухолями. В качестве контроля мышам с опухолями вводят 100 мкл PBS каждый день в течение 8 дней.

[0174] Через двадцать четыре часа после последней инъекции (9 день) мышей умерщвляют, а опухоли собирают и гомогенизируют. Супернатанты собирают и подвергают анализу на спектр цитокинов с использованием анализа на мышинные цитокины 32plex luminex.

[0175] Результаты: опухоли мышей, получавших VLP из примера 1, демонстрируют повышенные уровни провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантов по сравнению с опухолями мышей, получавших PBS.

Пример 6. Иммуномодуляция микроокружения опухоли с помощью VLP

[0176] Метод: в каждый из дней с 1 по 8 VLP ВПЧ и каждую из химерных VLP из примера 1 (100 мкг) вводят группам мышей с опухолями. В качестве контроля мышам с опухолями вводят 100 мкл PBS в каждый из дней с 1 по 8.

[0177] Через двадцать четыре часа (9 день) мышей умерщвляют, а опухоли собирают и диссоциируют на суспензию отдельных клеток. Эритроциты удаляют из суспензии с использованием лизирующего буфера для эритроцитов. Проточную цитометрию проводят с использованием BD Facscliber с антимышиными антителами, специфичными к CD45, ГКГС-II, CD86, CD11b, F4/80 и Ly6G, и сравнивают клеточный состав опухолей.

[0178] Результаты: введение VLP из примера 1 с целевым пептидом или без него вызывает резкие изменения в составе иммунных клеток в опухоли по сравнению с опухолями у мышей, получавших PBS.

Пример 7. Иммуноterapia VLP вызывает системный устойчивый противоопухолевый иммунитет.

[0179] Метод: VLP ВПЧ и каждую из химерных VLP примера 1 (100 мкг) непосредственно инъецировали в меланомы B16F10 у мыши. В опухолях быстро образуются центры омертвения опухолей, и у некоторых из обработанных мышей опухоли полностью устраняются.

[0180] Мышей, у которых опухоль была полностью устранена, повторно провокационно стимулируют путем инъекции клеток B16F10 в их бока с противоположной стороны через 4 недели после подтверждения полного исчезновения их первичных опухолей. У мышей, ранее излеченных от первичных опухолей B16F10 в боку путем внутриопухолевой инъекции химерных VLP, наблюдается увеличение

устойчивости к вторичной повторной провокационной стимуляции. Это свидетельствует о том, что непосредственная инъекция наночастиц химерных VLP в первичные опухоли вызывает защитный системный иммунный ответ против опухолей B16F10.

[0181] Результаты: химерные VLP с целевым пептидом вызывают системный устойчивый противоопухолевый иммунитет.

Пример 8. Химерные VLP способны перенаправлять неродственный Т-клеточный иммунитет на опухоль и способствовать элиминации

[0182] Метод: линию клеток рака яичника мыши ID8 со сверхэкспрессией люциферазы культивируют совместно с CD8⁺ Т-клетками OT-1, специфичными к эпитопу пептида овальбумина SIINF EKL (SEQ ID NO: 220). Затем к совместным культурам добавляют VLP с целевым пептидом, содержащим SIINF EKL (SEQ ID NO: 220), или без него.

[0183] Результат: предполагается, что гибель клеток (в виде уменьшенного сигнала люциферазы) не будет происходить с VLP без целевого пептида, совместно культивированных с CD8⁺ Т-клетками OT-1 и линией клеток рака яичника мыши ID8. Напротив, предполагается, что гибель опухолевых клеток в виде уменьшенного сигнала люциферазы будет наблюдаться в совместных культурах ID8/ Т-клеток OT-1, получивших химерные VLP, содержащие целевой пептид, содержащий SIINF EKL (SEQ ID NO: 220) («OVA-химерная VLP»).

[0184] Метод *in vivo*: мышей C57/BL6 в возрасте 10 недель с опухолями яичника получают путем инъекции линии клеток рака яичника мыши ID8. 100 мкг OVA-химерной VLP в/б вводят каждой мыши. Контролями являются (а) мыши, получившие в/б инъекцию 100 мкг/мышь VLP из примера 1 без целевого пептида, и (b) мыши, получившие в/б инъекцию 100 мкг/мышь химерных VLP из примера 1. VLP вводят мышам каждую неделю в течение четырех недель, и мышам внутрибрюшинно вводят дважды, то есть раз в две недели, $2,5 \times 10^6$ указанных выше CD8⁺ Т-клеток OT-1. Всех мышей наблюдают на предмет выживания. Небольшую часть мышей в каждой группе умерщвляют через 1 неделю после последнего введения VLP. Опухоли яичника собирают для измерения общей гистологии и инфильтрирующих Т-клеток.

[0185] Результаты. Предполагается, что опухоли мышей, получавших OVA-химерную VLP, имеют меньшую опухолевую массу, чем опухоли мышей, получавших VLP без целевого пептида, и опухоли мышей, получавших химерную VLP из примера 1. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты оценивают на наличие CD8⁺ Т-клеток, специфичных к SIINF EKL (SEQ ID NO: 220), с использованием окрашивания тетрамером H-2Kb, нагруженным SIINF EKL (SEQ ID NO: 220). Также анализируется доля SIINF EKL

(SEQ ID NO: 220)-специфичных CD8⁺ Т-клеток в общей популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (среднее $\pm$ СКО).

Пример 9. Химерные VLP способны перенаправлять неродственный Т-клеточный иммунитет, выработанной в результате введения человеческой детской вакцины, на опухоль

[0186] Группам трансгенных по HLA-A*0201 (AAD) мышей C57BL/6 трижды подкожно вводят одну десятую дозы химерных VLP из примера 1 с интервалами в одну неделю. Мышей умерщвляют через неделю после последней иммунизации и собирают спленоциты для анализа на HLA-A2-рестриктированные, специфичные к антигену детской вакцины ответы с использованием пептидов FMYSDFHF (SEQ ID NO: 136), KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6), или FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69), или SLPRSRTPI (SEQ ID NO: 218) или SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219) с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и анализов активации CD⁺ Т-клеток по интерферону-гамма. После окончания схемы вакцинации спленоциты совместно культивируют с химерными VLP из примера 1, содержащими целевой пептид, содержащий FMYSDFHF (SEQ ID NO: 136), KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6), или FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69), или SLPRSRTPI (SEQ ID NO: 218), или SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219), и оценивают на повторную активацию Т-клеток с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и анализов активации CD⁺ Т-клеток по интерферону-гамма. Голые VLP, то есть VLP, не содержащие целевые пептиды, используют в качестве контролей. Связывание и противоопухолевое действие VLP исследуют с помощью люминесцентной визуализации для измерения цитотоксичности *in vitro*. Несколько экспрессирующих люциферазу HLA-A2-положительных опухолевых линий, таких как ID8/A2 (рак яичника), B16/A2 (меланома), TC-1/A2 (рак шейки матки), совместно культивируют со спленоцитами мышей, трансгенных по HLA-A*0201 (AAD), вакцинированных химерными VLP. Поскольку эти линии опухолевых клеток не имеют антигенного родства с CD8⁺ Т-клеточным эпитопом целевых пептидов, уничтожение опухоли не наблюдается. Аналогичным образом, добавление голых VLP не оказывает или почти не оказывает уничтожающего действия на опухоль.

[0187] Результаты: предполагается, что добавление химерных VLP из примера 1, содержащих целевые пептиды, содержащие FMYSDFHF (SEQ ID NO: 136), KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6), или FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69), SLPRSRTPI (SEQ ID NO: 218), или SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219), в эту совместную культуру делает опухоли восприимчивыми к уничтожению цитотоксическими Т-клетками в культуре спленоцитов.

Пример 10. Химерные VLP способны перенаправлять неродственный Т-клеточный

иммунитет, выработанной в результате введения человеческой детской вакцины, на опухоль для ее элиминации.

[0188] Методы: приживление опухолей: трансгенным по HLA-A*0201 (AAD) мышам внутрибрюшинно (в/б) инъецируют экспрессирующие люцифразу опухолевые клетки ID8/A2.

[0189] Выработка ответа на детскую вакцину: после инъекции опухолевых клеток мышей, трансгенных по HLA-A*0201 (AAD), активно иммунизируют одной десятой человеческой детской вакцины против вируса гриппа, кори, гепатита В или ветряной оспы с интервалами в одну неделю, как описано в примере 8. Антигенный компонент вакцин содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп FMYSDFHFI (SEQ ID NO: 136) (грипп), или GILGFVFTL SEQ ID NO: 119 (грипп), или KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6) (корь), или FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69) (гепатит В), или SLPRSRTPI (SEQ ID NO: 218) (вирус ветряной оспы), или SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219) (вирус ветряной оспы). В каждой группе мышей выделяют подгруппу и умерщвляют, чтобы убедиться в формировании существующего иммунитета к детской вакцине и охарактеризовать его, как описано в примере 8.

[0190] Лечение и анализ противоопухолевых действий: мышам с опухолями внутрибрюшинно инъецируют химерные VLP или голые VLP (без целевого пептида) (100 мкг/мышь) еженедельно в течение 3 недель. Необработанные мыши служат в качестве контролей. За ростом опухолей наблюдают с помощью люминесцентной визуализации.

[0191] Результаты: предполагается, что у мышей с опухолями, получавших химерные VLP, будут наблюдаться терапевтические противоопухолевые действия, превышающие таковые для мышей, получавших голые VLP, и контрольных мышей. В частности, предполагается, что химерные VLP способны перенаправлять CD8⁺ Т-клетки, специфичные к Т-клеточному эпитопу целевого пептида, на опухоль, и ингибировать рост опухоли, и в некоторых случаях устранять опухоль, тогда как у контрольных мышей, получивших в/б инъекцию голых VLP, или вообще не получивших VLP, не перенаправляются CD8⁺ Т-клетки, специфичные к Т-клеточным эпитопам химерных VLP. Предполагается, что у контрольных мышей, получивших в/б инъекцию голых VLP, или вообще не получивших VLP, ингибирование роста опухоли и устранение опухоли наблюдается в гораздо меньшей степени, чем при введении химерных VLP с целевым пептидом.

Пример 11. Конструирование и синтез VLP, конъюгированных с эпитопом

[0192] VLP получали в клетках *Trichoplusia ni* (High FiveTM), по существу как описано в примере 1. Вкратце, VLP получали в клетках *Trichoplusia ni* (High FiveTM),

инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим ген химерного L1 папилломавируса согласно изобретению. VLP очищали центрифугированием в 40% растворе сахарозы, после чего проводили еще один цикл очистки в ступенчатом градиенте CsCl. Чистоту препарата VLP определяли с помощью SDS-PAGE, а морфологию частиц оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Типичные препараты имели чистоту более 90% и по данным ПЭМ выглядели как полностью собранные капсидоподобные частицы размером 50 нм (фиг. 2, левая секция изображений ПЭМ). Целевые пептиды (FMYSDFHFI (SEQ ID NO: 136) (грипп), или GILGFVFTL SEQ ID NO: 119 (грипп), или KLWESPQEI (SEQ ID NO: 6) (корь), или FLPSDFFPSV (SEQ ID NO: 69) (гепатит В), или SLPRSRTP1 (SEQ ID NO: 218) (вирус ветряной оспы), или SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219 (вирус ветряной оспы)) синтезировали до чистоты более 85% в виде поликатионных (N-концевой малемид-Arg4RVKR-эпитоп) 17-мерных пептидов, также известных как MAL-пептид. Для конъюгации пустые неконъюгированные VLP подвергали восстановительным условиям с помощью 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, 500 мМ NaCl, 2 мМ рабочего буфера EDTA с TCEP (68 мкМ, конечный) (TCEP:белок VLP (мол.:мол.) = 10:1). Смесь (объем = 625 мкл) осторожно перемешивали каждые 15 минут в течение 1 часа при 21 °C. После восстановления в течение 1 часа MAL-пептид (170 мкМ, 625 мкл) в рабочем буфере добавляли к VLP, предварительно обработанным TCEP, до соотношения пептид:белок RG-1 (мол.:мол.) = 25:1. Смесь осторожно перемешивали при приблизительно 250 об/мин при 21 °C в течение 1 часа, после чего сразу приступали к процессу очистки. После конъюгации композицию, содержащую конъюгированные VLP, подвергали диализу в PBS с pH 7, 500 мМ NaCl, после чего следовала стадия диафильтрации для удаления избытка пептида. Конъюгированные VLP («AIR VLP») анализировали с помощью ПЭМ. Результаты ПЭМ для нескольких партий AIR VLP были единообразными и демонстрировали, что VLP имеют немного больший размер (60-70 нм) по сравнению с пустыми неконъюгированными VLP (50 нм). Этот результат в сочетании с анализом AIR-VLP методом SDS-PAGE показывает, что с конъюгированной VLP было связано большое количество пептида. Этот процесс конъюгации может быть осуществлен с различными VLP, и его проводили с образованием VLP ВПЧ-16 RG-1 и VLP ВПЧ-16 дикого типа, конъюгированных со многими различными типами эпитопов детских вакцин, как показано на фиг. 3. На фиг. 3 изображен анализ VLP ВПЧ-16 RG-1 методом SDS PAGE (левая секция) или VLP L1 ВПЧ-16 дикого типа (правая секция), конъюгированных с эпитопами, полученными из вирусов гриппа, гепатита В, кори и ветряной оспы.

Пример 12. Опухолеспецифичное связывание различными VLP

[0193] Для подтверждения широкой способности химерных VLP, описанных в настоящей заявке, к связыванию опухолей авторы обрабатывали мышинные линии клеток рака шейки матки (ТС-1), рака яичника (ID8), рака молочной железы (4Т1) и меланомы (B16) 0,3 мкг/мл химерных VLP *in vitro* в течение 24 часов, окрашивали клетки на наличие связанных опухолью VLP, и затем анализировали окрашенные клетки методом проточной цитометрии.

[0194] На фиг. 4 изображен сдвиг в клеточной популяции, демонстрирующий связывание VLP со всеми протестированными линиями опухолевых клеток. В верхнем ряду на фиг. 4 показаны результаты связывания пустых VLP ВПЧ-16 RG-1 с различными линиями опухолевых клеток, а в нижнем ряду показаны результаты для VLP вируса папилломы быков (ВПБ), в одну из петель L1 которого был рекомбинантно вставлен пептид.

[0195] Чтобы продемонстрировать, что способность VLP связываться с опухолью не снижалась при конъюгировании пептидов на поверхности VLP, авторы повторили исследования связывания опухоли, описанные выше, с конъюгированными VLP. Аналогично результатам, полученным для неконъюгированных VLP, конъюгированные AIR-VLP сохраняли свою способность связываться с опухолевыми клетками (см. фиг. 5).

Пример 13. Антигенспецифичное перенаправление иммунного ответа на опухоли конъюгированными VLP приводит к связыванию, загрузке эпитопа CD8⁺ и уничтожению опухолевых клеток ЦТЛ, специфичными к покрытому эпитопу, *in vitro*.

[0196] Чтобы оценить пригодность конъюгированных VLP, описанных в настоящей заявке, в качестве агента, перенаправляющего иммунный ответ на опухоли, авторы сначала использовали модельный антиген OVA (SIINFEKL, SEQ ID NO: 220). Авторы конъюгировали этот рестриктированный мышиным H2-KB эпитоп OVA (SIINFEKL, SEQ ID NO: 220), содержащий сайт расщепления фурином, с VLP ВПЧ-16 RG-1 с получением химерной VLP (AIR-VLP). Затем опухолевые клетки инкубировали с различными количествами (концентрация от 1,00 пМ до 0,02 нМ) AIR-VLP или контрольных VLP, таких как пустые неконъюгированные VLP или имитация AIR VLP (композиция из неконъюгированных VLP и пептидов, не конъюгированных с VLP), *in vitro* в течение 24 часов, а затем инкубировали обработанные опухолевые клетки с 1×10^5 ОТ1-специфичных ЦТЛ. ОТ-1-специфичную активацию ЦТЛ оценивали по окрашиванию на поверхностный CD8 и внутриклеточный IFN- γ с последующим анализом методом проточной цитометрии. Значительно больше CD8⁺ IFN- γ ⁺ Т-клеток было обнаружено после инкубации с опухолевыми клетками, обработанными AIR-VLP, что свидетельствует о том, что обработка AIR-VLP успешно покрывала не экспрессирующие OVA опухолевые

клетки пептидами OVA, что привело к последующему распознаванию OT-1-специфичными ЦТЛ и их активации (см. фиг. 6).

[0197] Чтобы оценить пригодность VLP, конъюгированных с вирусным эпитопом CD8+, в качестве агента, перенаправляющего иммунный ответ на опухоли, авторы конъюгировали рестриктированный мышинным H2-DB эпитоп ВПЧ-16-E7 (амк. 49-57) с VLP папилломавируса быков, содержащей сайт расщепления фурином, с получением химерной VLP-R-E7. Затем авторы инкубировали опухолевые клетки ID8 с 0,3 мкг/мл пустых неконъюгированных VLP или химерных VLP-R-E7 *in vitro* в течение 24 часов, а затем инкубировали обработанные опухолевые клетки с 2×10^5 амк. 49-57 E7-специфичных ЦТЛ.

[0198] E7-специфичную активацию ЦТЛ оценивали по окрашиванию на поверхностный CD8 и внутриклеточный IFN- γ с последующим анализом методом проточной цитометрии. Значительно больше CD8+ IFN- γ + Т-клеток было обнаружено после инкубации с опухолевыми клетками ID8, обработанными химерными VLP-R-E7, что свидетельствует о том, что обработка химерными VLP-R-E7 успешно покрывала не экспрессирующие E7 опухолевые клетки ID8 пептидами E7, что привело к последующему распознаванию E7-специфичными ЦТЛ и их активации (см. фиг. 7).

[0199] Чтобы продемонстрировать, что перенаправление иммунного ответа, вызванное химерными VLP, может привести к цитотоксическому уничтожению покрытых опухолевых клеток, авторы продемонстрировали, что связывание AIR-VLP с опухолевыми клетками приводило к высвобождению ЦТЛ, что делало опухолевые клетки более восприимчивыми к уничтожению OVA-специфичными CD8+ Т клетками. Как показано на фиг. 8, инкубация AIR-VLP, но не пустых неконъюгированных VLP, приводила к наибольшей гибели опухолевых клеток, опосредованной уничтожением OVA-специфичными CD8+ Т-клетками, что проявлялось в значительном снижении люминесцентной активности (см. фиг. 8).

Опухолевые клетки ID8/luc обрабатывали 0,3 мкг/мл пустых неконъюгированных VLP или химерных VLP-R-E7 *in vitro* в течение 24 часов, а затем инкубировали обработанные опухолевые клетки с 2×10^4 амк. 49-57 E7-специфичных ЦТЛ. Затем авторы оценивали жизнеспособность опухолевых клеток с помощью биолюминесцентной визуализации на основе экспрессии люциферазы живыми клетками ID8/luc. Значительно более низкая активность люциферазы наблюдалась для опухолевых клеток ID8, обработанных химерными VLP-R-E7 и инкубированных с E7-специфичными ЦТЛ, что указывает на значительное снижение жизнеспособности опухолевых клеток ID8 после обработки. В совокупности эти данные демонстрируют способность химерных VLP,

конъюгированных с целевым пептидом, покрывать опухолевые клетки и нагружать поверхностный ГКГС-I опухолевых клеток целевым пептидом, что приводит к последующему уничтожению покрытых опухолевых клеток активированными ЦТЛ (см. фиг. 9).

Таблица I

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
SMLNSQAIDNLRA	1	Корь	A*02:01	Слитый белок	26579122	Человек
LMIDRPYVL1	2	Корь	A*02:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
VIINDDQGLFKV	3	Корь	A*02:01	Матрикс	26579122	Человек
KIIDNTEQL	4	Корь	A*02:01	Матрикс	26579122	Человек
RLSDNGYYTV	5	Корь	A*02:01	Матрикс	26579122	Человек
KLWESPQEI	6	Корь	A*02:01	С-белок	26579122	Человек
KLIDGFFPA	7	Корь	A*02:01	полимераза	26579122	Человек
SMYRVFEV	8	Корь	A*02:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
KVSPYLFTV	9	Корь	A*02:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
SLMPEETLHQV	10	Корь	A*02:01	полимераза	26579122	Человек
RQAGQEMILAV	11	Корь	A*02:01/B*1 5:01	Слитый белок	26579122	Человек
GSAPISMGFR	12	Корь	A*03:01	Ген PVC	26579122	Человек
GMYG GTYLVEK2	13	Корь	A*03:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
AVRDLERAMTTL K	14	Корь	A*03:01	С-белок	26579122	Человек
YVYDHSGEAVK	15	Корь	A*03:01/A*1 1:01	Ген PVC	26579122	Человек
AIYTAEIHK	16	Корь	A*03:01/A*1 1:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
GPRQAQVSF(L)	17	Корь	B*07:02	Нуклеокапси	26579122	Человек

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
				д		
YPALGLHEF	18	Корь	B*07:02/B*3 5:01	Нуклеокапси д	26579122	Человек
RPGLKPDL	19	Корь	B*07:02	Слитый белок	26579122	Человек
IPYQGSKGVSF	20	Корь	B*07:02/B*3 5:01	Гемагглютин ин	26579122	Человек
KPNLSSKRSEL	21	Корь	B*07:02	Гемагглютин ин	26579122	Человек
RPIYGLEV	22	Корь	B*07:03	полимераза	26579122	Человек
DALLRLQAM	23	Корь	B*08:01	Нуклеокапси д	26579122	Человек
FPKLGKTL	24	Корь	B*08:01	Ген PVC	26579122	Человек
LLKEATEL	25	Корь	B*08:01	Матрикс	26579122	Человек
IPPMKNLAL	26	Корь	B*08:01	Гемагглютин ин	26579122	Человек
DIKEKVINL	27	Корь	B*08:01	полимераза	26579122	Человек
HILAKSTAL	28	Корь	B*08:01	полимераза	26579122	Человек
YLKDKALA	29	Корь	B*08:01	полимераза	26579122	Человек
GLNEKLVFY	30	Корь	B*15:01	Матрикс	26579122	Человек
RITHVDTESY	31	Корь	B*15:01	Слитый белок	26579122	Человек
LLKKGNSLY	32	Корь	B*15:01	полимераза	26579122	Человек
SKESQHVY	33	Корь	B*15:01	полимераза	26579122	Человек
AQRLNEIY	34	Корь	B*15:01	полимераза	26579122	Человек
SQQGMFHAY	35	Корь	B*15:01	полимераза	26579122	Человек
SMIDLVTKF	36	Корь	B*15:01	полимераза	26579122	Человек
IVSSHFFVY6	37	Корь	B*15:01	полимераза	26579122	Человек
EPIGSLAIEEAM	38	Корь	B*35:01	Ген PVC	26579122	Человек
EPIRDALNAM	39	Корь	B*35:01	Слитый белок	26579122	Человек

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
APVFHMTNY	40	Корь	B*35:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
SAVRIATVY	41	Корь	B*35:01	полимераза	26579122	Человек
MPEETLHQVM	42	Корь	B*35:01	полимераза	26579122	Человек
LPAPIGGMNY	43	Корь	B*35:01	полимераза	26579122	Человек
AEGGEIHEL	44	Корь	B*40:01	Ген РVС	26579122	Человек
AEVDGDVKL	45	Корь	B*40:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
LETRTTNQFL	46	Корь	B*40:01	Гемагглютинин	26579122	Человек
KESQHVYYL	47	Корь	B*40:01	полимераза	26579122	Человек
YESGVRIASL	48	Корь	B*40:01	полимераза	26579122	Человек
QEISRHQALGY	49	Корь	B*44:02	Ген РVС	26579122	Человек
KEIKETGRLF	50	Корь	B*44:02	полимераза	26579122	Человек
AENLISNGIGKY	51	Корь	B*44:02	полимераза	26579122	Человек
AVRDLERAM	52	Корь	C*03:04	Ген РVС	26579122	Человек
FRSVNAVAF	53	Корь	C*07:02	Матрикс	26579122	Человек
ARVPHAYSL	54	Корь	C*07:02	полимераза	26579122	Человек
TDTPIVYNDRNL(L D)	55	Корь	Неизвестна	Нуклеокапсид	26579122	Человек
KKQINRQN	56	Корь	Неизвестна	Ген РVС	26579122	Человек
DTGVDTRIW	57	Корь	Неизвестна	Ген РVС	26579122	Человек
DQGLFKVL	58	Корь	Неизвестна	Матрикс	26579122	Человек
GKIIDNTEQL	59	Корь	Неизвестна	Матрикс	26579122	Человек
GRLVPQVRVID	60	Корь	Неизвестна	Матрикс	26579122	Человек
GPPISLERLDVGTN	61	Корь	Неизвестна	Слитый белок	26579122	Человек
APVFHMTNYLEQP VS(N)	62	Корь	Неизвестна	Гемагглютинин	26579122	Человек
PTTIRGQFS	63	Корь	Неизвестна	Гемагглютинин	26579122	Человек

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
HYREVNLVY	64	Корь	Неизвестна	полимераза	26579122	Человек
(K)KVDTNFIY(QQ)	65	Корь	Неизвестна	полимераза	26579122	Человек
LSEIKGVIVHRLEG V	66	Корь	H-2K	Слитый белок	9129158	мыши
LDRLVRLIG	67	Корь	H-2K	Нуклеокапси д	9129158	мыши
RRYPDAVYL	68	Корь	HLA-B27 / HLA-A2.1/Kb	Слитый белок	10998329	HLA- A2.1Kb трансген ные мыши/ люди
FLPSDFFPSV	69	Гепатит В		Коровый белок	10751335	Человек
FLLTRILTI	70	Гепатит В		ENV	10751335	Человек
WLSLLVPFV	71	Гепатит В		ENV	10751335	Человек
GLSRYVARL	72	Гепатит В		POL	10751335	Человек
FLLSLGIHL	73	Гепатит В		POL	10751335	Человек
MDIDPYKEFGATV ELLSFLP	74	Гепатит В		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
RDLLDTASALYRE ALESPEHCSPHH	75	Гепатит В		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
TWVGVNLEDPAS RDLVVSyvNTNM G	76	Гепатит В		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
VVSyvNTNMGLK	77	Гепатит		Нуклеокапси	US488214	Человек

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
FRQL		B		д	5A	
VVSYYVNTNMGLK	78	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
LLWFHISCLTFGR ETVIEYLV	79	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
LLWFHISCLTF	80	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
VSFGVWIRTPPA,	81	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
VSFGVWIRTPPAY RPPNAPIL	82	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
PPAYRPPNAPIL	83	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
WIRTPPAYRPPN	84	Гепатит B		Нуклеокапси д	US488214 5A	Человек
LLAQFTSAI	85	Гепатит B		POL	US200300 99634	Человек
ALMPLYAC	86	Гепатит B		POL	US200300 99634]	Человек
KLHLYSHPI	87	Гепатит B		POL	US200300 99634	Человек
YLHTLWKAGI	88	Гепатит B		POL	US200300 99634]	Человек
YLHTLWKAGV	89	Гепатит B		POL	US200300 99634	Человек
LLVPFVQWFV	90	Гепатит B		ENV	US200300 99634	Человек
ILLCLIFLL	91	Гепатит B		ENV	US200300 99634	Человек
VLLDYQGML	92	Гепатит B		ENV	US200300 99634	Человек

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
LLPIFFCLWV	93	Гепатит В		ENV	US200300 99634	Человек
VLQAGFFLL	94	Гепатит В		ENV	US200300 99634	Человек
PLLPIFFCL	95	Гепатит В		ENV	US200300 99634	Человек
ILSTLPETTV	96	Гепатит В		Нуклеокапси д	US200300 99634	Человек
NCTCIPISSYAFG KFLTGY	97	Гепатит В		ENV	WO199300 3764A1	Человек
ASARFSYLSLLVPF VGYFVG	98	Гепатит В		ENV	WO199300 3764A1	Человек
LSPTVYLSVIYMM YYYGPSL	99	Гепатит В		ENV	WO199300 3764A1	Человек
TNMGLKFRLLYFH ISCLYF	100	Гепатит В		Коровый белок	WO199300 3764A1	Человек
AAFEDLRVLSFIRG	101	Грипп А	HLA-B37	NP		Человек
AGFIENGWEGMV DGWYGFRHQNSE GTGQAADLKS	102	Грипп А		HA		ЧЕЛОВЕ К
AIMDKNIIL	103		HLA- A*0201; HLA- A*020101; HLA-A2.1	NS1		ЧЕЛОВЕ К; МЫШЬ
ASCMGLIY	104	Грипп А	HLA-B*35; HLA-B*3501	M1		ЧЕЛОВЕ К
ASGRVTVSTKRSQ QTV	105	Грипп А		HA		ЧЕЛОВЕ К
ASQGTKRSYEQME	106	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕ

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
TDGERQNATE						К
ATGMRNVPEKQT RGIFGAIAGFIENG WEGMVD	107	Грипп А		НА		ЧЕЛОВЕК
CTELKLSDY	108	Грипп А	HLA-A*0101; HLAA1	NP		ЧЕЛОВЕК
CVNGSCFTV	109	Грипп А	HLA-A*0201	NA		ЧЕЛОВЕК; МЫШЬ
CYPYDVPDYASLR SLV	110	Грипп А				
CYPYDVPDYASLR SLVASS	111	Грипп А				
CYPYDVPDYASLR SLVASSGTLEFINE DFNWT	112	Грипп А		НА		ЧЕЛОВЕК
DPRMCSLMQGSTL P	113	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕК
DYASLRSLVASSG TLEFINEGFNWTG VTQNGGSSAC	114	Грипп А		НА		ЧЕЛОВЕК
EDLTFLARSAL	115	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕК
ELRSRYWAI	116	Грипп А	HLA-B8	NP		ЧЕЛОВЕК
ENQHTIDLTDSM NKLFEKTRKQLRE NAEDMGNGCF	117	Грипп А		НА		ЧЕЛОВЕК
FEDLRVLS	118	Грипп А	HLA-B37	NP		ЧЕЛОВЕК

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
						К
GILGFVFTL	119	Грипп А	HLA- A*0201; HLA- A*020101; HLA- A*0203; HLA- A*0206; HLA-A2; HLA-A2.1	M1	U.S. 15/421,758	ЧЕЛОВЕ К; МЫШЬ
GILGFVFTLT	120	Грипп А	HLA- A*0201; HLA-A2	M1		ЧЕЛОВЕ К; МЫШЬ
GILGFVFTLTV	121	Грипп А	HLA-A2; HLA-AW69			ЧЕЛОВЕ К
GKNTDLEVLMEW LKTRPILS	122	Грипп А	HLA-A2	M1		ЧЕЛОВЕ К
HHPSTDRDQTSLY VRASGRVTVSTKR SQQTVPNI	123	Грипп А		HA		ЧЕЛОВЕ К
KGILGFVFTLTV	124	Грипп А	HLA-A*02; HLA- A*0201; HLA-A2	M1		ЧЕЛОВЕ К; МЫШЬ
KLSTRGVQIASNE N	125	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕ К
LKGKFQTAAQRA MMDQVRES	126	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕ К
LPRRSGAAGAAVK G	127	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕ К

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
LRVLSFIRGTKVSP RGKLSTRG	128	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕК
LTKGILGFVFTLTV PSERG	129	Грипп А	HLA-A2.1	M1		ЧЕЛОВЕК
PSFDMSNEGSYFF GDNAEEYDN	130	Грипп А		NP		ЧЕЛОВЕК
RGLQRRRFVQNAL NGNG	131	Грипп А	HLA-A2	M1		ЧЕЛОВЕК
RRSGAAGAAVK	132	Грипп А	HLA-B27	NP		ЧЕЛОВЕК
RYWAIRTR	133	Грипп А	HLA-B*2705	NP		ЧЕЛОВЕК
SRYWAIRTR	134	Грипп А	HLA- B*08;HLAB* 2703; HLAB*2705; HLAB*27052 /KB; HLAB27	NP		ЧЕЛОВЕК; МЫШЬ
VSDGGPNLY	135	Грипп А	HLA- A*0101; HLAA1; MAMU-A*02	PB1		ЧЕЛОВЕК
FMYSDFHFI	136	Грипп А	HLA- A*0201; HLA- A*0202; HLA-A*0206	PA		ЧЕЛОВЕК
ILGFVFTLTV	137	Грипп А	HLA- A*0201; HLAA*02010	M1		ЧЕЛОВЕК; МЫШЬ

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Аллель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
			1; HLAA*0203			
NMLSTVLGV	138	Грипп А	HLA- A*0201; HLAA*0206; HLAA*6802	PB1		ЧЕЛОВЕК
RMVLASTTAK	139	Грипп А	HLA- A*0301; HLAA*11; HLA-A11	M1		ЧЕЛОВЕК
SIIPSGPLK	140	Грипп А	HLA- A*3101; HLAA11	M1		ЧЕЛОВЕК
SLENFRAYV	141	Грипп А	HLA- A*0201; HLAA*0203; HLAA*6802	PA		ЧЕЛОВЕК
LTKGILGFVFTLTV PSERGL	142	Грипп А	HLA-A2	M1	3029268	ЧЕЛОВЕК
GLCTLVAML	143	Вирус Эпштейн а-Барр	HLA-A2		9143694	ЧЕЛОВЕК
ARNLVPMVATVQ GQ	144	CMV	HLA-A2	pp65		ЧЕЛОВЕК
RKTPRVTGGGAM AGA	145	CMV	HLA-B7	pp65	8892876	ЧЕЛОВЕК
QEFFWDANDIYRI FA	146	CMV	HAL-B8	pp65	8892876	ЧЕЛОВЕК
ARNLVPMVATVQ GQN	147	CMV	HLA-A2	pp65	8892876	ЧЕЛОВЕК
YYTSAFVFPTKD	148	CMV	HLA-B35	pp65	8892876	ЧЕЛОВЕК

Последовательность эпитопа	SEQ ID NO:	Тип вируса	Алель ГКГС	Вирусный белок	Ссылка (PMID/№ патента)	Вид
						К
VFPTKDVALRH	149	CMV	HLA-B35	pp65	8892876	ЧЕЛОВЕК
DDVWTSGSDSDEE LV)	150	CMV	HLA-B35	pp65	8892876	ЧЕЛОВЕК
NLVPMVATV	151	CMV	HLA-A2	pp65		ЧЕЛОВЕК
VAIEVDNEQPTTR AQKL	152	Полиоми елит		VP1	7679749	
TRAQKLFAMWRIT YKDTV	153	Полиоми елит		VP1	7679749	
GACVAIEVDNEQ PTTRAQKLFAMW RITYKDTVQLRRK L	154	Полиоми елит	ЛЮБОЙ 9- МЕР В ЭТОЙ ПОСЛЕДОВ АТЕЛЬНОС ТИ	VP1	7679749	

Таблица 2 Кодированные EBV эпитопы ЦТЛ*

Антиген EBV	Координаты эпитопа	Последовательность эпитопа	Рестрикция HLA I класса	SEQ ID NO :	Специфичность к типу EBV
Антигены латентного цикла					
EBNA1	407–417	HPVGEADYFEY	B35.01	155	отсутствует
EBNA2	42–51	DTPLIPLTIF	?A2/B51	156	1 тип
EBNA3 A	158–166	QAKWRLQTL	B8	157	1 тип
	176–184	AYSSWMYSY	A30.02	158	1 и 2 тип

Антиген EBV	Координаты эпитопа	Последовательность эпитопа	Рестрикция HLA I класса	SEQ ID NO	Специфичность к типу EBV
Антигены латентного цикла					
	246–253	RYSIFFDY	A24	159	1 тип
	325–333	FLRGRAYGL	B8	160	1 тип
	379–387	RPPIFIRRL	B7	161	1 тип
	406–414	LEKARGSTY	B62	162	1 тип
	450–458	HLAAQGMAY	?	163	1 тип
	458–466	YPLHEQHGM	B35.01	164	1 тип
	491–499	VFSDGRVAC	A29	165	1 тип
	502–510	VPAPAGPIV	B7	166	1 тип
	596–604	SVRDRLARL	A2	167	1 и 2 тип
	603–611	RLRAEAQVK	A3	168	1 и 2 тип
EBNA3 В	101–115	NPTQAPVIQLVHAVY	A11	169	1 тип
	149–157	HRCQAIRKK	B27.05	170	отсутствует
	217–225	TYSAGIVQI	A24.02	171	1 тип
	244–254	RRARSLSAERY	B27.02	172	1 тип
	399–408	AVFDRKSDAK	A11	173	1 тип
	416–424	IVTDFSVIK	A11	174	1 тип
	481–495	LPGPQVTAVLLHEES	A11	175	1 тип
	488–496	AVLLHEESM	B35.01	176	1 тип
	551–563	DEPASTEPVHDQLL	A11	177	1 тип
	657–666	VEITPYKPTW	B44	178	1 тип
	831–839	GQGGSP TAM	B62	179	1 тип
EBNA3 С	163–171	EGGVGWRHW	B44.03	180	1 и 2 тип
	213–222	QNGALAINTE	B62	181	2 тип
	249–258	LRGKWQRRYR	B27.05	182	1 тип
	258–266	RRIYDLIEL	B27.02/.04/.05	183	1 тип

Антиген EBV	Координаты эпитопа	Последовательность эпитопа	Рестрикция HLA I класса	SEQ ID NO	Специфичность к типу EBV
Антигены латентного цикла					
	271–278	HHIWQNLL	B39	184	1 и 2 тип
	281–290	EENLLDFVRF	B44.02	185	1 и 2 тип
	284–293	LLDFVRFMGV	A2.01	186	1 и 2 тип
	335–343	KEHVIQNAF	B44.02	187	1 тип
	343–351	FRKAQIQGL	B27.05	188	1 тип
	881–889	QPRAPIRPI	B7	189	1 и 2 тип
EBNA-LP		Зарегистрированы единичные ответы, эпитопы не определены			
LMP1		Зарегистрированы единичные ответы, эпитопы не определены			
LMP2	131–139	PYLFWLAAI	A23	190	1 и 2 тип
	200–208	IEDPPFNSL	B60	191	1 и 2 тип
	236–244	RRRWRLTV	B27.04	192	1 и 2 тип
	329–337	LLWTLVLL	A2.01	193	1 и 2 тип
	340–350	SSCSCPLSKI	A11	194	1 и 2 тип
	419–427	TYGPVFMCL	A24	195	1 и 2 тип
	426–434	CLGGLTMV	A2.01	196	1 и 2 тип
	442–451	VMSNTLLSAW	A25	197	1 и 2 тип
	453–461	LTAGFLIFL	A2.06	198	1 и 2 тип
BZLF1	190–197	RAKFKQLL	B8	199	отсутствует
	186–201	RKCCRAKFKQLLQHYR	C6	200	отсутствует
BMLF1	265–273	KDTWLDARM	?	201	отсутствует
	280–288	GLCTLVAML	A2.01	143	отсутствует
	397–405	DEVEFLGHY	B18	202	отсутствует
BMRF1	86–100	FRNLAYGRTCVLGKE	C3	203	отсутствует
	268–276	YRSGIIAVV	C6	204	отсутствует

* Источник: Rickson and Moss, Annu. Rev. Immunol. (1997) 15:405-31, полностью включенный в настоящую заявку посредством ссылки.

Последовательность белка L1 ВПЧ-16 (114K) SEQ ID NO: 205

Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val

1 5 10 15

Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn

20 25 30

Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro

35 40 45

Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys

50 55 60

Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro

65 70 75 80

Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln

85 90 95

Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro

100 105 110

Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp

115 120 125

Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg
130 135 140

Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly
145 150 155 160

Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr
165 170 175

Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn
180 185 190

Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met
195 200 205

Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile
210 215 220

Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu
225 230 235 240

Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe
245 250 255

Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Asn Val Pro
260 265 270

Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser
275 280 285

Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala
290 295 300

Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn
305 310 315 320

Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr
325 330 335

Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu
340 345 350

Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu
355 360 365

Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr
370 375 380

Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu
385 390 395 400

Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp

405

410

415

Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr

420

425

430

Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu

435

440

445

Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu

450

455

460

Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe

465

470

475

480

Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr

485

490

495

Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu

500

505

[0200] Последовательность нуклеиновой кислоты L1 ВПЧ-16 I114K) (SEQ ID NO:
206)

atgtctcttt ggctgcctag tgaggccact gtctacttgc ctctgtccc agtatctaag 60

gttgtaagca cggatgaata tggcgcacgc acaaacatat attatcatgc aggaacatcc 120

agactacttg cagttggaca tccctatctt cctattaaaa aacctaacaa taacaaaata 180

ttagttccta aagtatcagg attacaatac agggatttta gaatacattt acctgacccc 240

aataagtttg gtttctga cacctcattt tataatccag atacacagcg gctggttgg 300

gcctgtgtag gtgtgaggt aggtcgtggt cagccattag gtgtgggcat tagtggccat 360

ctttattaa ataaattgga tgacacagaa aatgctagtg cttatgcagc aaatgcaggt 420

gtggataata gagaatgtat atctatggat tacaacaaa cacaattgtg ttaattggt 480

tgcaaaccac ctatagggga aactggggc aaaggatccc catgtaccaa tgtgcagta 540

aatccaggtg attgtccacc attagagtta ataacacag ttattcagga tggatgatg 600

gttgatactg gcttgggtgc tatggacttt actacattac aggctaaca aagtgaagtt 660

ccactggata ttgtacatc tattgcaaa tatccagatt atattaaaat ggtgtcagaa 720

ccatatggcg acagcttatt ttttattta cgaagggaac aaatgttgt tagacattta 780

ttaataggg ctggtactgt tggtgaaaat gtaccagacg attatacat taaaggctct 840

gggtctactg caaatatgc cagttcaaatt ttttctta cacctagtgg ttctatggtt 900

acctctgatg cccaatatt caataaacct tattggttac aacgagcaca gggccacaat 960

aatggcattt gttggggtaa ccaactattt gttactgttg ttgatactac acgcagtaca 1020

aatatgtcat tatgtgctgc catatctact tcagaaacta catataaaaa tactaacttt 1080

aaggagtacc tacgacatgg ggaggaatat gatttacagt ttattttca actgtgcaaa 1140

ataaccttaa ctgcagacgt tatgacatac atacattcta tgaattccac tttttggag 1200

gactggaatt ttggtctaca acctccccca ggaggcacac tagaagatac ttataggttt 1260

gtaacatccc aggcaattgc ttgtcaaaaa catacacctc cagcacctaa agaagatccc 1320

cttaaaaaat acactttttg ggaagtaaat ttaaaggaaa agttttctgc agacctagat 1380

cagtttcctt taggacgcaa atttttacta caagcaggat tgaaggccaa accaaaattt 1440

acattaggaa aacgaaaagc tacaccacc acctcatcta cctctacaac tgctaaacgc 1500

aaaaaacgta agctgtaa 1518

Последовательность белка L2 ВПЧ (SEQ ID NO: 207)

Met Arg His Lys Arg Ser Ala Lys Arg Thr Lys Arg Ala Ser Ala Thr

1 5 10 15

Gln Leu Tyr Lys Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys Pro Pro Asp Ile

20 25 30

Ile Pro Lys Val Glu Gly Lys Thr Ile Ala Asp Gln Ile Leu Gln Tyr

35 40 45

Gly Ser Met Gly Val Phe Phe Gly Gly Leu Gly Ile Gly Thr Gly Ser

50 55 60

Gly Thr Gly Gly Arg Thr Gly Tyr Ile Pro Leu Gly Thr Arg Pro Pro

65 70 75 80

Thr Ala Thr Asp Thr Leu Ala Pro Val Arg Pro Pro Leu Thr Val Asp

85 90 95

Pro Val Gly Pro Ser Asp Pro Ser Ile Val Ser Leu Val Glu Glu Thr
100 105 110

Ser Phe Ile Asp Ala Gly Ala Pro Thr Ser Val Pro Ser Ile Pro Pro
115 120 125

Asp Val Ser Gly Phe Ser Ile Thr Thr Ser Thr Asp Thr Thr Pro Ala
130 135 140

Ile Leu Asp Ile Asn Asn Thr Val Thr Thr Val Thr Thr His Asn Asn
145 150 155 160

Pro Thr Phe Thr Asp Pro Ser Val Leu Gln Pro Pro Thr Pro Ala Glu
165 170 175

Thr Gly Gly His Phe Thr Leu Ser Ser Ser Thr Ile Ser Thr His Asn
180 185 190

Tyr Glu Glu Ile Pro Met Asp Thr Phe Ile Val Ser Thr Asn Pro Asn
195 200 205

Thr Val Thr Ser Ser Thr Pro Ile Pro Gly Ser Arg Pro Val Ala Arg
210 215 220

Leu Gly Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Gln Gln Val Lys Val Val Asp Pro
225 230 235 240

Ala Phe Val Thr Thr Pro Thr Lys Leu Ile Thr Tyr Asp Asn Pro Ala
245 250 255

Tyr Glu Gly Ile Asp Val Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ser Ser Asn Asp
260 265 270

Asn Ser Ile Asn Ile Ala Pro Asp Pro Asp Phe Leu Asp Ile Val Ala
275 280 285

Leu His Arg Pro Ala Leu Thr Ser Arg Arg Thr Gly Ile Arg Tyr Ser
290 295 300

Arg Ile Gly Asn Lys Gln Thr Leu Arg Thr Arg Ser Gly Lys Ser Ile
305 310 315 320

Gly Ala Lys Val His Tyr Tyr Tyr Asp Phe Ser Thr Ile Asp Pro Ala
325 330 335

Glu Glu Ile Glu Leu Gln Thr Ile Thr Pro Ser Thr Tyr Thr Thr Thr
340 345 350

Ser His Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ile Asn Asn Gly Leu Tyr Asp Ile
355 360 365

Tyr Ala Asp Asp Phe Ile Thr Asp Thr Ser Thr Thr Pro Val Pro Ser
370 375 380

Val Pro Ser Thr Ser Leu Ser Gly Tyr Ile Pro Ala Asn Thr Thr Ile
385 390 395 400

Pro Phe Gly Gly Ala Tyr Asn Ile Pro Leu Val Ser Gly Pro Asp Ile
405 410 415

Pro Ile Asn Ile Thr Asp Gln Ala Pro Ser Leu Ile Pro Ile Val Pro
420 425 430

Gly Ser Pro Gln Tyr Thr Ile Ile Ala Asp Ala Gly Asp Phe Tyr Leu
435 440 445

His Pro Ser Tyr Tyr Met Leu Arg Lys Arg Arg Lys Arg Leu Pro Tyr
450 455 460

Phe Phe Ser Asp Val Ser Leu Ala Ala

[0201] Последовательность нуклеиновой кислоты L2 ВПЧ-16 (SEQ ID NO: 208)

atgcgacaca aacgttctgc aaaacgcaca aaacgtgcat cggctaccca actttataaa 60

acatgcaaac aggcaggtac atgtccacct gacattatac ctaaggttga aggcaaaact 120

attgctgatac aaatattaca atatggaagt atgggtgtat ttttggtgg gtttaggaatt 180

ggaacagggt cgggtacagg cggacgcact gggtatatc cattgggaac aaggcctccc 240

acagctacag atacacttgc tcctgtaaga cccctttaa cagtagatcc tgtgggcct 300

tctgatcctt ctatagttc ttagtgga gaaactagtt ttattgatgc tggtcacca 360

acatctgtac cttccattcc ccagatgta tcaggattta gtattactac ttcaactgat 420

accacacctg ctatattaga tattaataat actgttacta ctgttactac acataataat 480

cccactttca ctgaccatc tgtattgcag cctccaacac ctgcagaaac tggaggcat 540

tttaccttt catcatccac tattagtaca cataattatg aagaaattcc tatggataca 600

tttattgta gcacaaacc taacacagta actagtagca cacccatacc agggctctgc 660

ccagtggcac gcctaggatt atatagtcgc acaacacaac aagttaaagt ttagaccct 720

gcttttgtaa ccactccac taaacttatt acatatgata atcctgcata tgaaggata 780

gatgtggata atacattata ttttctagt aatgataata gtattaatat agctccagat 840

cctgactttt tggatatagt tgctttacat aggccagcat taacctctag gcgtactggc 900

ataaggta gtagaattgg taataacaa acactacgta ctgtagtgg aaaatctata 960

ggtgctaagg tacattatta ttatgattt agtaccattg atcctgcaga agaaatagaa 1020

ttacaaacta taacaccttc tacatatact accacttcac atgcagctc acctactct 1080

attaataatg gattatatga tatttatgca gatgacttta ttacagatac ttctacaacc 1140

ccggtacat ctgtaccctc tacatcttta tcagggtata ttctgcaaa tacaacaatt 1200

ccttttggtg gtgcatacaa tattccttta gtatcaggtc ctgatatacc cattaatata 1260

actgaccaag ctccttcatt aattcctata gttccagggt ctccacaata tacaattatt 1320

gctgatgcag gtgactttta ttacatcct agttattaca tgttacgaaa acgacgtaaa 1380

cgtttaccat atttttttc agatgtctct ttgget 1416

Сайт расщепления фурином

R X R/K R (SEQ ID NO: 209)

Сайт расщепления фурином

Arg Val Lys Arg (SEQ ID NO: 210)

Расщепляемый MMP пептидный субстрат

Glu Pro Cit Gly Hof Tyr Leu (SEQ ID NO: 211)

Расщепляемый MMP пептидный субстрат

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln (SEQ ID NO: 212)

Расщепляемый MMP пептидный субстрат

Pro Val Gly Leu Ile Gly (SEQ ID NO: 213)

Сайт полиглутаминовой кислоты для прикрепления

EEEEEEEEEC (SEQ ID NO: 214).

Сайт полиглутаминовой кислоты для прикрепления

CEEEEEEEEC (SEQ ID NO: 215).

Пептид EBNA3C, амк. 284-293, связывает HLA-A2.01

LLDRVRFMGV (SEQ ID NO: 216)

Пептид EBV

(K)GILGFVFTL(T)(V) (SEQ ID NO: 217)

CD8+ T-клеточный эпитоп вируса ветряной оспы

SLPRSRTPI (SEQ ID NO:218)

CD8+ T-клеточный эпитоп вируса ветряной оспы

SAPLPSNRV (SEQ ID NO: 219)

Пептид OVA

SIINFEKL (SEQ ID NO: 220)

Последовательность VLP RG-1

MSLWLPSEAT VYLPPVPVSK VVSTDEYVAR TNIYYHAGTS RLLAVGHPYF

PIKKPNNNKI	LVPKVSGLQY	RVFRIHLPDP	NKFGFPDTSF	YNPDTQRLVW
ACVGVEVGRG	QPLGVGISGH	PLLNKLDDTE	NASAYAQLYK	TCKQAGTCPP
DIIPKVANAG	VDNRECISMD	YKQTQLCLIG	CKPPIGEHWG	KGSPCTNVAV
NPGDCPPEL	INTVIQDGDM	VDTGFGAMDF	TTLQANKSEV	PLDICTSICK
YPDYIKMVSE	PYGDSLFFYL	RREQMFVRHL	FNRAVAVGEN	VPDDLVIKGS
GSTANLASSN	YFPTPSGSMV	TSDAQIFNKP	YWLQRAQGHN	NGICWGNQLF
VTVVDTTTRST	NMSLCAAIST	SETTYKNTNF	KEYLRHGEEY	DLQFIFQLCK
ITLTADVMTY	IHSMNSTILE	DWNFGLQPPP	GGTLEDTYRF	VTSQAIACQK
HTPPAPKEDP	LKKYTFWEVN	LKEKFSADLD	QFPLGRKFLL	QAGLKAKPKF

TLGKRKATPT TSSTSTTAKR KKRKLSR (SEQ ID NO: 221)

Пептид, полученный из белка L2 ВПЧ

QLYKTCKQAG TCPPDIIPKV (SEQ ID NO: 222)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерная вирусоподобная частица (VLP), содержащая белок L1 вируса папилломы (ВП) и экспонируемый на поверхности целевой пептид, причем указанный целевой пептид содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп человеческого патогена, где CD8+ Т-клеточный эпитоп не является опухолеассоциированным антигеном, где целевой пептид конъюгирован с VLP и где целевой пептид не конъюгирован с VLP посредством последовательности полиионный.цистеин.
2. Химерная VLP по п. 1, дополнительно содержащая белок L2 ВП.
3. Химерная VLP по п. 1, где целевой пептид конъюгирован с цистеином, лизином или аргинином белка L1 посредством дисульфидной связи, малеимидной связи или амидной связи.
4. Химерная VLP по п. 2, где целевой пептид конъюгирован с цистеином, лизином или аргинином белка L2 посредством дисульфидной связи, малеимидной связи или амидной связи.
5. Химерная VLP по п. 1, где целевой пептид не является пептидом вируса папилломы.
6. Химерная VLP по п. 1, где CD8+ Т-клеточный эпитоп получен из антигенного полипептида, содержащегося в детской вакцине.
7. Химерная VLP по п. 1, где патоген представляет собой вирус, бактерию, гриб или паразита.
8. Химерная VLP по п. 7, где вирус представляет собой вирус коровьей оспы, вирус ветряной оспы, вирус опоясывающего герпеса, краснуху, вирус гепатита, например, вирус гепатита А, или вирус гепатита В, или вирус гепатита С, вирус гриппа типа А или типа В, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус полиомиелита, вирус натуральной оспы, вирус бешенства, вирус денге, вирус Эбола, вирус лихорадки Западного Нила, вирус желтой лихорадки или вирус Зика.
9. Химерная VLP по п. 1, где целевой пептид содержит пептид, приведенный в таблице 1.
10. Химерная VLP по п. 7, где бактерия представляет собой коклюшную палочку (*bordatella pertussis*), столбнячную палочку (*Clostridium tetani*), хламидию трахоматис (*chlamydia trachomatis*), дифтерийную палочку, гемофильную палочку (*hemophilus influenza*), менингококк, например, менингококковую инфекцию ACWY, пневмококк, холерный вибрион (*vibrio cholera*), палочку Коха (*Mycobacterium tuberculosis*), БЦЖ, бактерию брюшного тифа, кишечную палочку (*E. coli*), сальмонеллу,

Legionella pneumophila, риккетсии, бледную трепонему (*Treponema pallidum*), подвида *pallidum*, стрептококк группы А или группы В, пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*), бациллу антракса (*Bacillus anthracis*), *Clostridium botulinum* или виды рода иерсинии (*Yersinia* sp.), например, чумную палочку (*Yersinia pestis*).

11. Химерная VLP по п. 7, где паразит представляет собой дизентерийную амебу (*Entamoeba histolytica*), токсоплазму гондии (*Toxoplasma gondii*), виды рода трихинеллы (*Trichinella* sp.), например, *Trichinella spiralis*, виды рода трихомонады (*Trichomonas* sp.), например, влагалищную трихомонаду (*Trichomonas vaginalis*), виды рода трипаномы (*Trypanosoma* sp.), например, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* или *Trypanosoma cruzi*, или плазмодию, например, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* или *Plasmodium malariae*.

12. Химерная VLP по п. 1, где белок L1 представляет собой белок L1 ВПБ-1 или ВПЧ типов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 15, 16, 17, 18, 23, 27, 38, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 58, 66, 68, 70, 76 и 92.

13. Химерная VLP по п. 2, где белок L2 представляет собой белок L2 ВПБ-1 или ВПЧ типов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 15, 16, 17, 18, 23, 27, 38, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 58, 66, 68, 70, 76 и 92.

14. Химерная VLP по п. 1, где белок L1 содержит более трех цистеинов, представленных на поверхности VLP.

15. Химерная VLP по п. 14, где белок L1 представляет собой белок L1 ВПЧ-16 RG-1 (SEQ ID NO: 221).

16. Химерная VLP по п. 15, где белок L1 содержит QLYKTCKQAG TCPPDIPKV (SEQ ID NO: 222).

17. Химерная VLP по п. 1, где пептид конъюгирован с одной или более из петли DE, петли HI или петли спирали B4 белка L1.

18. Химерная VLP по п. 1, где целевой пептид конъюгирован с петлей спирали B4 L1 ВП-16 человека (L1 ВПЧ-16) или конъюгирован с петлей DE ВП быков (ВПБ), или эквивалентными аминокислотами 136/137 ВП.

19. Способ ингибирования роста раковых клеток, включающий приведение клеток в контакт с композицией, содержащей эффективное количество химерной VLP по любому из пп. 1-16.

20. Способ ингибирования роста, прогрессирования или метастазирования опухоли у субъекта, включающий

(а) установление, был ли нуждающийся в этом субъект иммунизирован или вакцинирован против патогена,

(b) введение указанному субъекту химерной подобной вирусу папилломы частицы (VLP) в количестве, достаточном для ингибирования роста, прогрессирования или метастазирования опухоли,

где химерная VLP содержит белок L1 вируса папилломы и целевой пептид, где целевой пептид конъюгирован с цистеином, лизином или аргинином белка L1, где целевой пептид содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп патогена, против которого указанный субъект был иммунизирован, и где целевой пептид экспонируется на поверхности химерной VLP.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий определение молекул ГКГС I класса, экспрессируемых на клетках субъекта, и выбор химерной VLP, где целевой пептид, как известно, связывает молекулу ГКГС I класса, с последующим введением субъекту указанной химерной VLP.

22. Способ по п. 20, где патоген представляет собой вирус, бактерию или паразита.

23. Способ по п. 20, где вирус представляет собой вирус коревой оспы, вирус ветряной оспы, вирус опоясывающего герпеса, краснуху, вирус гепатита, например, вирус гепатита А, или вирус гепатита В, или вирус гепатита С, вирус гриппа типа А или типа В, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус полиомиелита, вирус натуральной оспы, вирус бешенства, вирус денге, вирус Эбола, вирус лихорадки Западного Нила, вирус желтой лихорадки или вирус Зика.

24. Способ по п. 22, где бактерия представляет собой коклюшную палочку (*bordatella pertussis*), столбнячную палочку (*Clostridium tetani*), хламидию трахоматис (*chlamydia trachomatis*), дифтерийную палочку, гемофильную палочку (*hemophilus influenza*), менингококк, например, менингококковую инфекцию ACWY, пневмококк, холерный вибрион (*vibrio cholera*), палочку Коха (*Mycobacterium tuberculosis*), БЦЖ, бактерию брюшного тифа, кишечную палочку (*E. coli*), сальмонеллу, *Legionella pneumophila*, риккетсии, бледную трепонему (*Treponema pallidum*), подвид *pallidum*, стрептококк группы А или группы В, пневмококк (*streptococcus pneumonia*), бациллу антракса (*Bacillus anthracis*), *clostridium botulinum*, виды рода иерсинии (*Yersinia sp.*), например, чумную палочку (*Yersinia pestis*).

25. Способ по п. 22, где паразит представляет собой дизентерийную амёбу (*enamoeba histolytica*), токсоплазму гондии (*toxoplasma gondii*), виды рода трихинеллы (*trichinella sp.*), например, *trichinella spiralis*, виды рода трихомонады (*trichomonas sp.*), например, влагалищную трихомонаду (*trichomonas vaginalis*), виды рода трипаносомы (*trypanosoma sp.*), например, *trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*,

Trypanosoma cruzi, плазмодию, например, *plasmodium falciparum*, *plasmodium vivax* или *plasmodium malariae*.

26. Способ по п. 20, где целевой пептид конъюгирован с цистеином белка L1 посредством дисульфидной связи или малеимидной связи.

27. Способ по п. 26, где целевой пептид конъюгирован с петлей белка L1.

28. Способ по п. 26, где целевой пептид не конъюгирован с петлей белка L1.

29. Способ по п. 20, где CD8⁺ Т-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп, приведенный в таблице 1.

30. Способ по п. 29, где CD8⁺ Т-клеточный эпитоп связывается с молекулой ГКГС I класса, приведенной в таблице I.

31. Способ по п. 30, где молекула ГКГС I класса представляет собой HLA-A*02:01, HLA-A*03:01/HLA-A*11:01, HLA-A*0201, HLA-A*020101, HLA-A*0203, HLA-A*0206, HLA-A2, HLA-A2.1 или HLA-A*02.

32. Способ по п. 21, где CD8⁺ Т-клеточный эпитоп связывается с молекулой ГКГС I класса семейства HLA-A, HLA-B или HLA-C.

33. Способ по п. 20, дополнительно характеризующийся тем, что химерные VLP вводят после радиационной терапии или химиотерапии.

34. Способ по п. 20, дополнительно включающий введение субъекту ингибитора контрольных точек.

35. Способ по п. 34, где ингибитор контрольных точек и химерную VLP вводят последовательно или по существу в одно и то же время.

36. Способ по п. 34, где ингибитор контрольных точек представляет собой ипилимумаб (Yervoy®), пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®), атезолизумаб (Tecentriq), авелумаб (Bavencio), дурвалумаб (Imfinzi).

37. Способ ингибирования роста рака у субъекта, включающий

(a) идентификацию указанного субъекта как субъекта, страдающего от рака,

(b) определение вакцины, содержащей антигенный агент, которая ранее была введена указанному субъекту,

(c) введение указанному субъекту композиции, содержащей эффективное количество химерной VLP, содержащей белок L1 вируса папилломы и целевой пептид, где целевой пептид конъюгирован с белком L1 и указанный целевой пептид содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп антигенного агента, содержащегося в вакцине, которая ранее была введена указанному субъекту,

где химерную VLP вводят в количестве, достаточном для стимуляции у указанного субъекта иммунного ответа, включающей стимуляцию CD8⁺ Т-клеток, специфичных к

CD8+ Т-клеточному эпитопу указанного антигенного агента, и ингибирования тем самым роста рака.

38. Способ ингибирования роста рака у субъекта, включающий

(a) идентификацию указанного субъекта как субъекта, имеющего опухоль,

(b) введение указанному субъекту химерной VLP в количестве, достаточном для индукции у указанного субъекта клеточного иммунного ответа на целевой пептид,

где химерная VLP содержит белок L1 или белок L2, или оба белка L1 и L2 вируса папилломы, и целевой пептид, где целевой пептид конъюгирован с цистеином, лизином или аргинином белка L1 или L2, где целевой пептид содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, не являющийся опухолеассоциированным антигеном опухоли, и где клеточный иммунный ответ ингибирует рост опухоли.

39. Способ получения химерной VLP по п. 1, включающий сбор VLP из белка L1 или белка L1 и белка L2 вируса папилломы, подвергание VLP восстановительным условиям, достаточным для восстановления VLP при сохранении капсидоподобной икосаэдрической структуры VLP, и конъюгирование целевого пептида с восстановленной VLP с образованием таким образом химерной VLP.

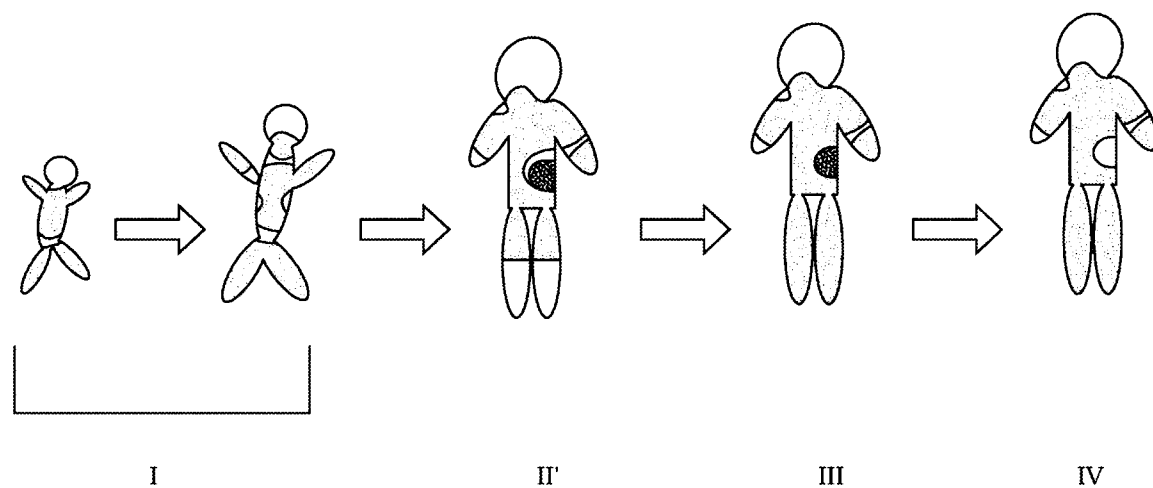
40. Способ по п. 39, где целевой пептид конъюгирован с цистеином и/или лизином белка L1 или L2 VLP.

41. Способ по п. 39, где целевой пептид конъюгирован с белком L1 или L2 VLP посредством дисульфидной связи, малеимидной связи или амидной связи.

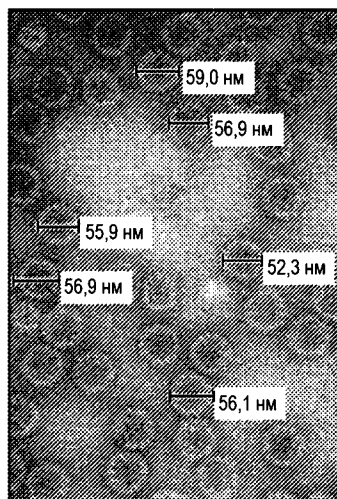
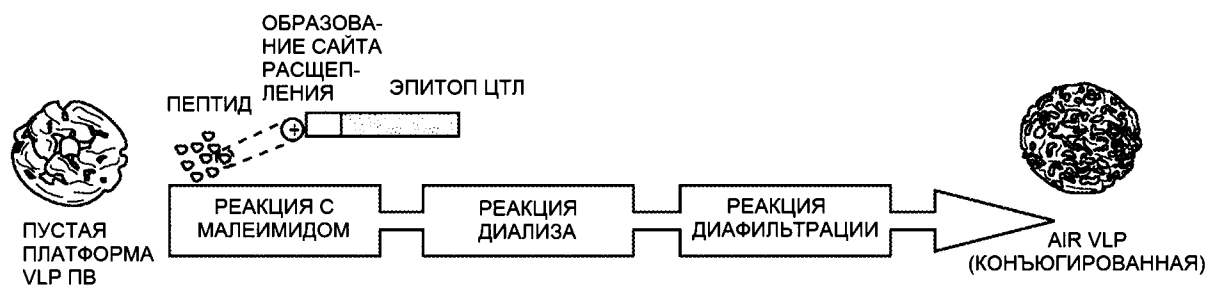
42. Способ по п. 40, где по меньшей мере 30 % поверхностных цистеинов VLP содержат целевой пептид.

43. Способ по п. 39, где по меньшей мере около 30 % поверхностных цистеинов VLP содержат целевой пептид.

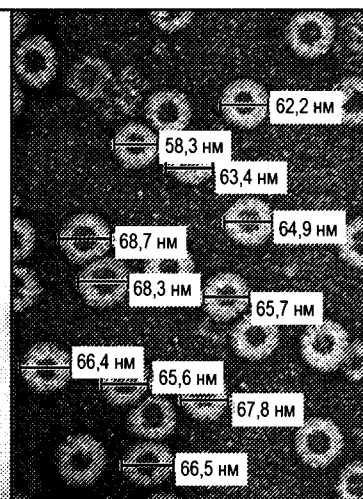
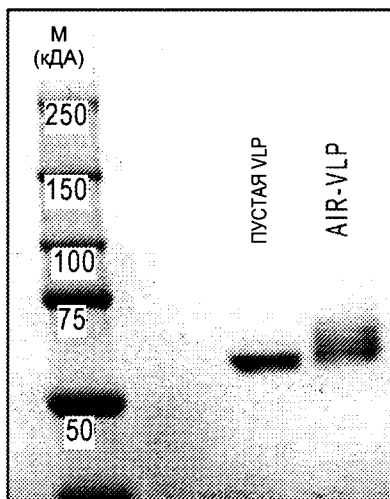
44. Композиция, содержащая популяцию химерных VLP, где каждая VLP содержит белок L1 вируса папилломы и целевой пептид, где по меньшей мере 30 % цистеинов, или 30 % лизинов, или 30 % как цистеинов, так и лизинов VLP конъюгированы с целевым пептидом посредством дисульфидной связи или малеимидной связи.



Фиг. 1

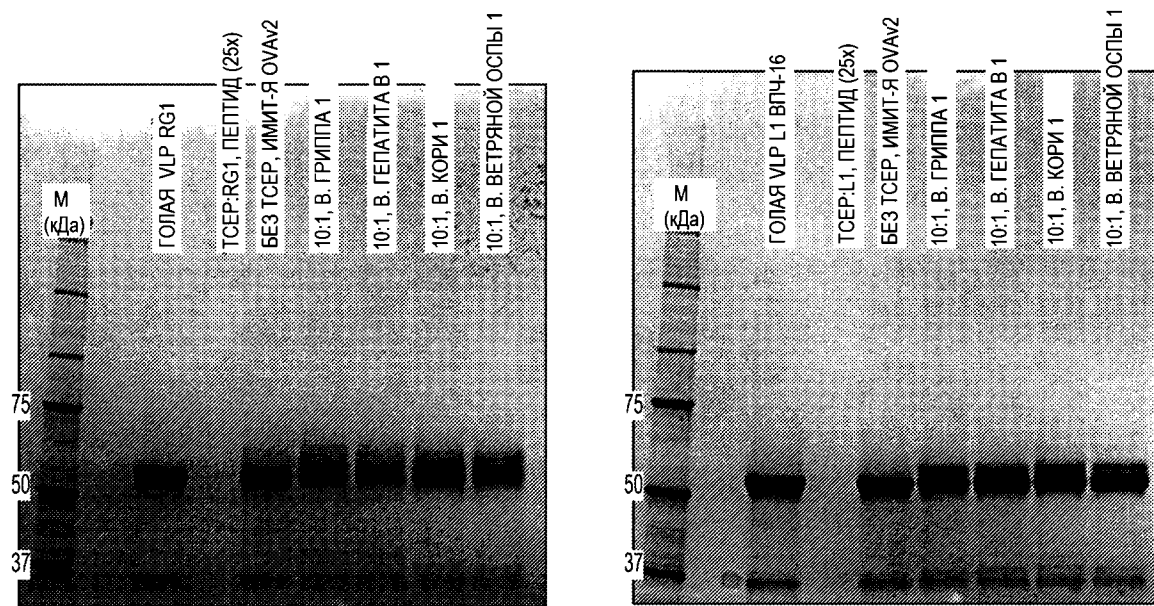


КОНТРОЛЬНАЯ (ПУСТАЯ) VLP

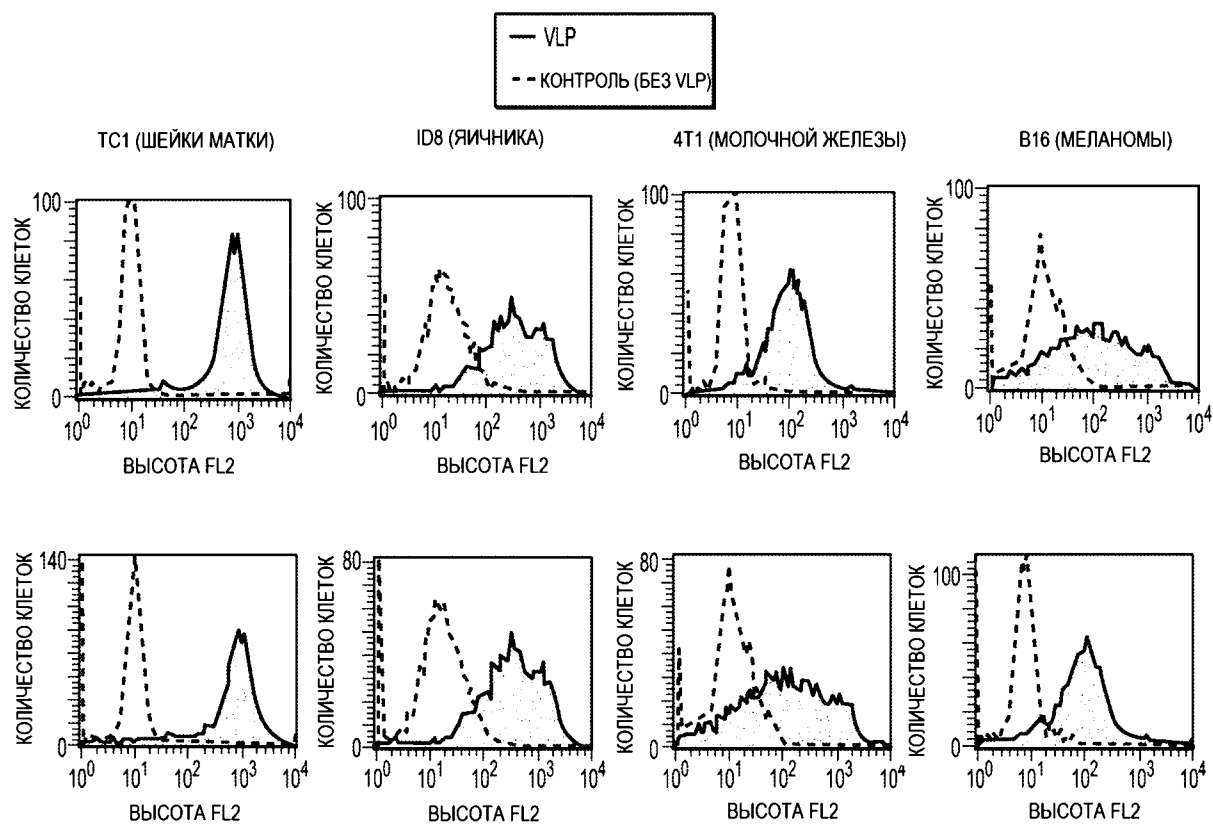


КОНЬЮГИРОВАННАЯ AIR VLP

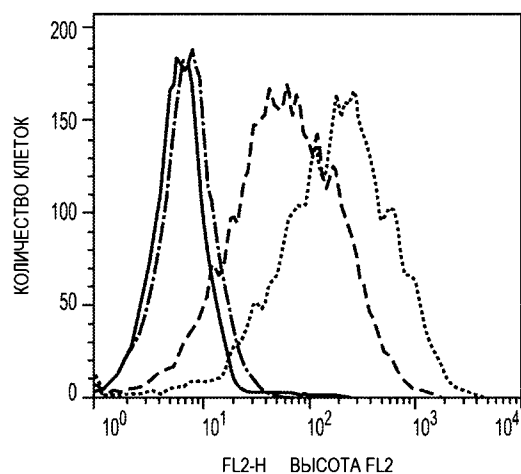
Фиг. 2



Фиг. 3

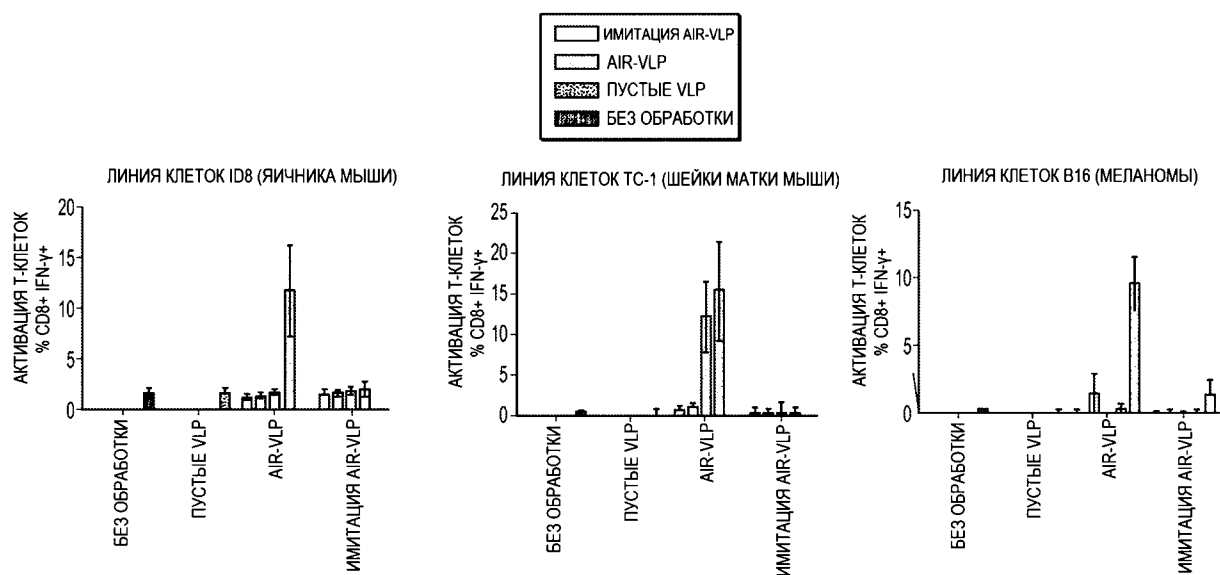


Фиг. 4



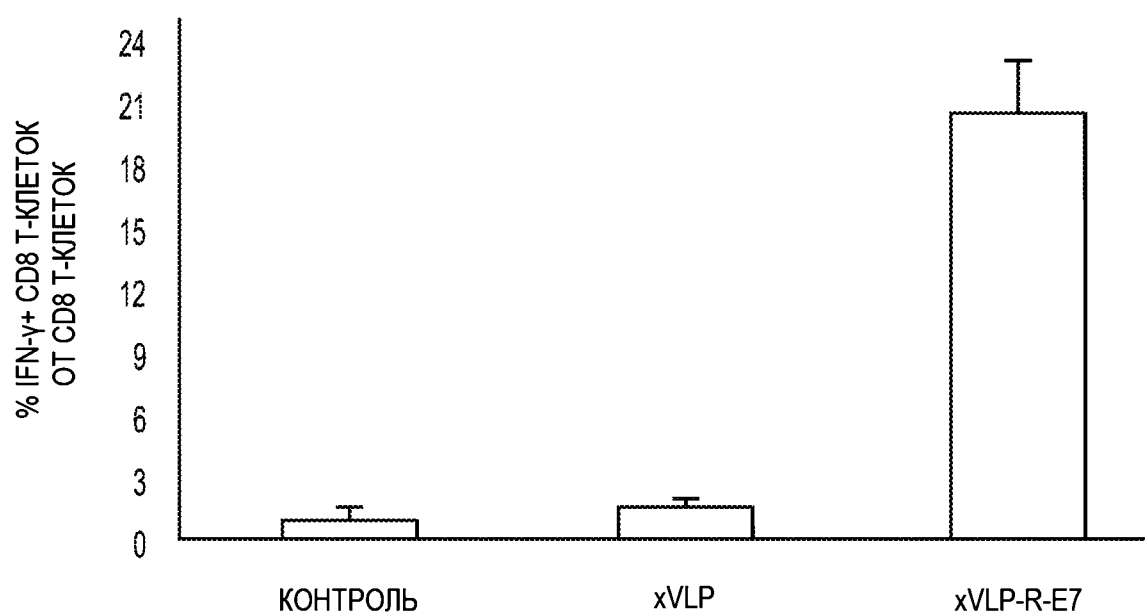
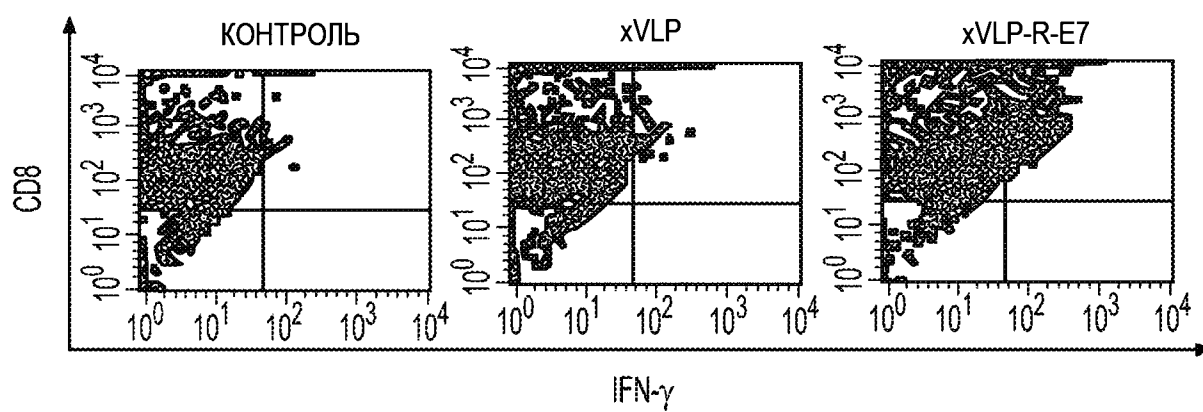
ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОБРАЗЦЕ	
—	БЕЗ ОБРАБОТКИ (ТОЛЬКО КЛЕТКИ)
.....	КЛЕТКИ ТС-1 С ПУСТЫМИ VLP
----	КЛЕТКИ ТС-1 С КОНЬЮГИРОВАННЫМИ VLP
-.-.-.-	КЛЕТКИ ТС-1 С КОНЬЮГИРОВАННЫМИ VLP, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ИНКУБИРОВАННЫМИ С ГЕПАРИНОМ, ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ, ЧТО СВЯЗЫВАНИЕ ОСТАЕТСЯ HSPG-СПЕЦИФИЧНЫМ

Фиг. 5



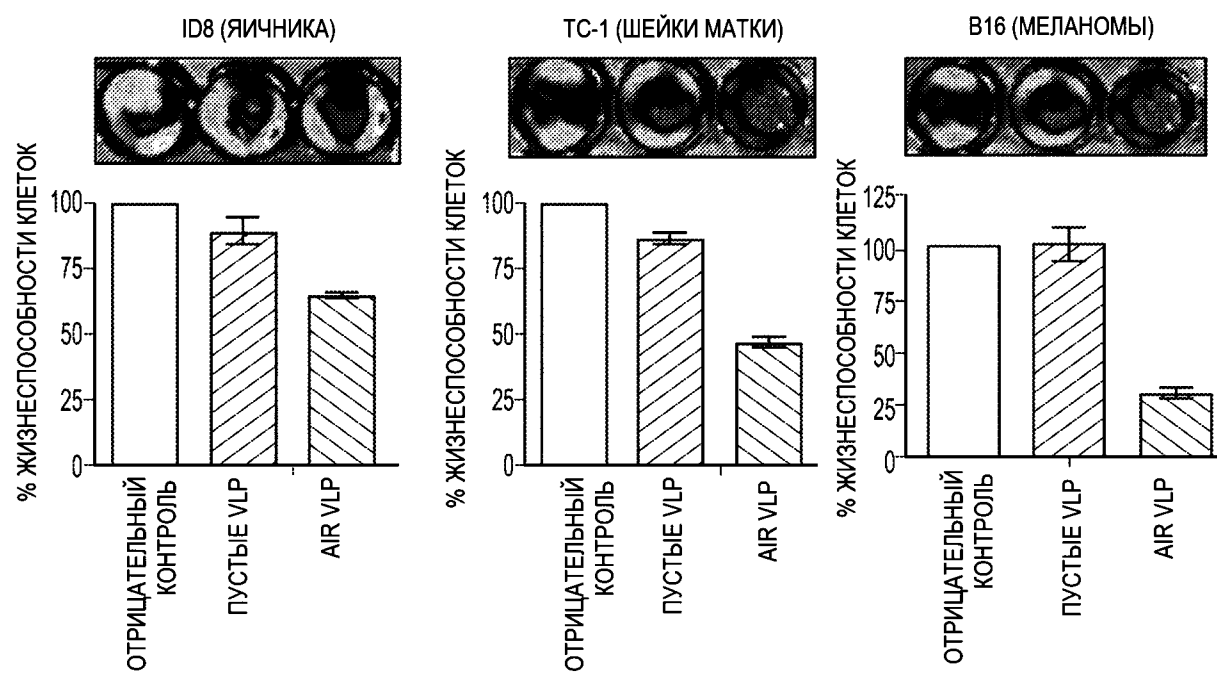
СВЯЗЫВАНИЕ И ЗАГРУЗКА ПЕПТИДОВ ОТ-1 НА AIR-VLP НА МЫШИНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ IN VITRO И ПОСЛЕДУЮЩАЯ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНАЯ АКТИВАЦИЯ ЦТЛ

Фиг. 6

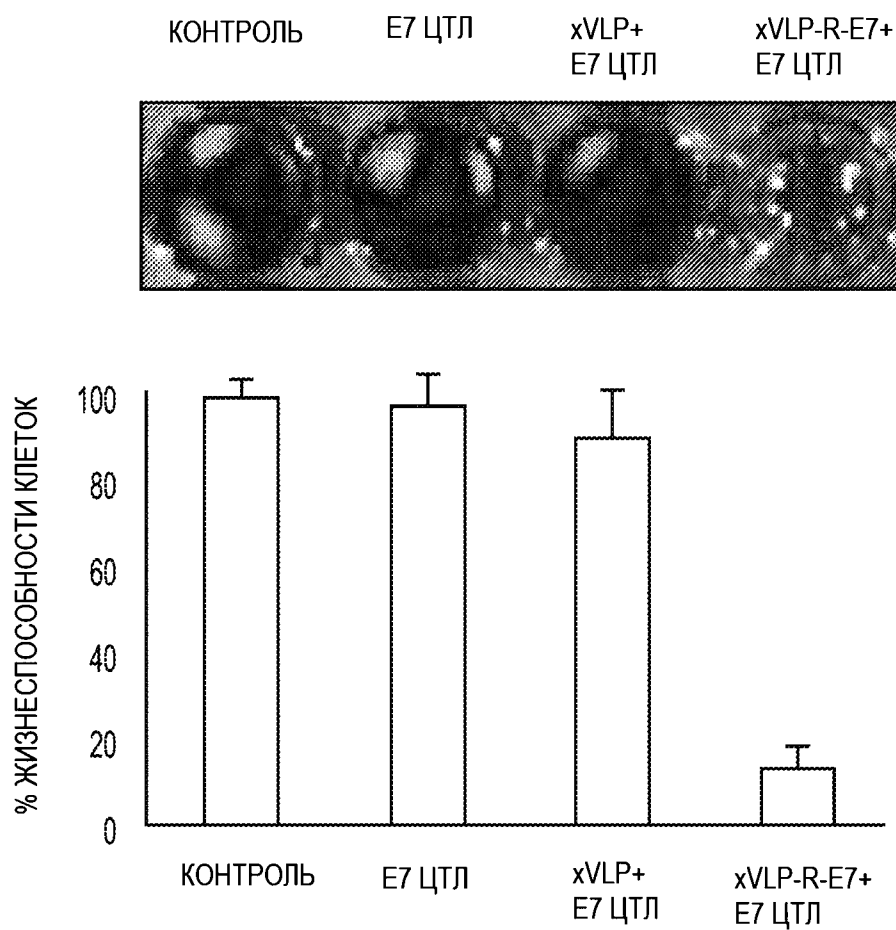


ПРЕЗЕНТАЦИЯ ПЕПТИДА E7 С ПОМОЩЬЮ ГКГС-I E7-СПЕЦИФИЧНЫМ ЦТЛ
ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ ID8, ОБРАБОТАННЫМИ xVLP-R-E7

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9