

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038049**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.29

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

(21) Номер заявки
201792045

(22) Дата подачи заявки
2016.03.16

(54) **НОВЫЙ КОМПЛЕКС, СОДЕРЖАЩИЙ ПРОНИКАЮЩИЙ В КЛЕТКУ ПЕПТИД, КАРГО-МОЛЕКУЛУ И ПЕПТИДНЫЙ АГОНИСТ TLR**

(31) **PCT/EP2015/000580;**
PCT/EP2015/002244

(56) **WO-A1-2014041505**
WO-A1-2012048190
EP-A1-2476440
WO-A1-2013120073

(32) **2015.03.16; 2015.11.09**(33) **EP**(43) **2018.03.30**(86) **PCT/EP2016/000471**(87) **WO 2016/146260 2016.09.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМАЛЬ ТЕРАПЬЮТИКС СА (CH)

TIMO BUHL ET AL.: "Internalization routes of cell-penetrating melanoma antigen peptides into human dendritic cells", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, vol. 23, no. 1, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 20-26, XP055227802, COPENHAGEN; DK, ISSN: 0906-6705, DOI: 10.1111/exd.12285, the whole document

(72) Изобретатель:
Деруази Мадиха, Бельнуэ Элоди (CH)

TONG TONG ZHANG ET AL.: "LAH4 enhances CD8⁺ T cell immunity of protein/peptide-based vaccines", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 30, no. 4, 12 November 2011 (2011-11-12), pages 784-793, XP028434525, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2011.11.056 [retrieved on 2011-11-21], the whole document

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

WO-A1-2011036211
M. DEROUAZI ET AL.: "Novel Cell-Penetrating Peptide-Based Vaccine Induces Robust CD4⁺ and CD8⁺ T Cell-Mediated Antitumor Immunity", CANCER RESEARCH, vol. 75, no. 15, 26 June 2015 (2015-06-26), pages 3020-3031, XP055227770, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3017, the whole document

(57) В изобретении описан новый комплекс, содержащий: а) проникающий в клетку пептид; б) по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп; и в) по меньшей мере один пептидный агонист TLR, в котором компоненты а)-в) ковалентно связаны. Кроме того, в изобретении описана также нуклеиновая кислота, кодирующая комплекс, где комплекс представляет собой пептид или белок. Указанная нуклеиновая кислота может содержаться в векторе, а такой вектор может содержаться в клетке-хозяине. В частности, в изобретении описаны композиции, такие как фармацевтические композиции и вакцины, которые можно применять, например, для предупреждения и/или лечения заболеваний и/или нарушения, включая рак, гематологические нарушения, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения и отторжения трансплантатов.

B1**038049****038049 B1**

Изобретение относится к области вакцинации, прежде всего к противораковым вакцинам.

Иммунная система может распознавать и в некоторой степени элиминировать опухолевые клетки, однако уровень противоопухолевого ответа часто является низким и неэффективным. Усиление этого слабого противоопухолевого ответа с помощью терапевтической вакцинации уже давно является целью противораковой терапии. Таким образом, модуляция иммунной системы с целью повышения иммунных ответов представляет собой перспективный терапевтический подход в онкологии, так ее можно объединять со стандартными методами ухода за больными.

Многообещающие результаты доклинических исследований и успехи в клинических испытаниях, включая одобренную в настоящее время FDA вакцину Sipuleucel-T и антитело к CTLA-4, продемонстрировали, что активная иммунизация является безопасным и реальным путем лечения некоторых типов рака. Опубликованы данные об индукции иммунных ответов, опосредуемых опухоль-специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), с использованием различных подходов, включая вакцины на основе модифицированных опухолевых клеток, пептидные вакцины, рекомбинантные вирусные векторы, вакцины на основе ДНК, белка или дендритных клеток. Однако противоопухолевый иммунитет, опосредуемый CTL, только в редких случаях коррелирует с регрессом опухолей, и лишь несколько проектов достигли фазы III клинических испытаний.

В целом, к настоящему времени для противораковых вакцин продемонстрирована очень ограниченная клиническая эффективность. Так, известно, что к концу 2011 г. из 30000 проводимых клинических испытаний противораковых вакцин только 19 достигли фазы III испытаний (Global Data, 2012). Среди них NeuVax, пептидная вакцина для рака молочной железы, Stimuvax, вакцина на основе липосом для немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) и рака молочной железы, TG4010, вакцина на основе вируса коровьей оспы для NSCLC, и GSK1572932A, липосома с адьювантом для NSCLC. Эти четыре противораковые вакцины основаны на различных технологиях и общим для них является то, что каждая из них направлена на один-единственный антиген.

Терапевтические противораковые вакцины можно разделять на две принципиальные категории: персонализированные (аутологичные) и стандартизированные вакцины, и их дополнительно классифицируют в зависимости от технологической платформы. Современные персонализированные вакцины включают вакцины на основе опухолевого лизата, а также вакцину на основе дендритных клеток (далее в контексте настоящего описания обозначена как вакцина на основе клеток). В последнем случае для загрузки антигена можно использовать либо введение в импульсном режиме опухолевых лизатов, либо трансфекцию с помощью РНК, экстрагированной из опухолей. В этом случае антигены являются специфическими для опухоли или ассоциированы с ней, но не являются строго определенными. Дендритные клетки можно вносить также с определенными антигенами либо с помощью обработки в импульсном режиме пептидом, либо с использованием белка, такого как простатическая кислая фосфатаза (PAP), который применяли для создания вакцины Provenge®. Однако процесс производства этих терапевтических агентов на основе клеток требует больших временных затрат и является трудоемким, и при этом трудно обеспечивать и поддерживать стандарты качества. Иммуномониторинг создает дополнительные сложности. Кроме того, большая часть аутологичных противораковых вакцин не позволяют идентифицировать или количественно оценивать антигены, которые следует контролировать, в отличие от имеющих заданный состав и стандартизированных вакцин.

В отличие от терапии на основе клеток (APC, Т-клетки, CAR, лизаты) субъединичные вакцины (белок или пептиды) позволяют разрабатывать стандартизованную вакцину с использованием более простого процесса получения и с улучшенной в значительной степени воспроизводимостью от партии к партии, которую можно вводить широкому кругу пациентов. Кроме того, антигены являются полностью определенными, что позволяет улучшать иммуномониторинг и снижать риск нежелательных явлений, связанных с компонентом вакцины.

Различные подходы, которые оценивали в доклинических и клинических исследованиях, включают вакцины на основе коротких пептидов (Slingluff C.L., Jr., The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? Cancer journal 17(5), 2011, сс. 343-350), вакцины на основе длинных пептидов (Melief C.J., van der Burg SH., Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. Nature reviews Cancer 8(5), 2008, сс. 351-360) и на основе белков. В отличие от вакцин на основе длинных пептидов и белков вакцины на основе коротких пептидов обладают очень коротким временем полужизни и могут оказывать отрицательное воздействие на иммунный ответ.

В случае вакцин на основе белков результаты таргетинга MAGE-A3 с помощью вакцины на основе рекомбинантного слитого белка оказались очень оптимистическими после многообещающих данных, полученных на фазе II, в отношении метастатической меланомы (Kruit W.H., Suci S., Dreno B., Mortier L., Robert C., Chiarion-Sileni V. и др., Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 31(19), 2013, сс. 2413-2420) и немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) (Vansteenkiste J., Zielinski M., Linder A., Dahabreh J., Gonzalez E.E., Malinowski W. и др., Adjuvant

MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(19), 2013, сс. 2396-2403). Однако в 2013 г. на фазе III исследования на коже (DERMA-исследование) в отношении меланомы (NCT00796445) не подтверждена первичная конечная точка, в затем в 2014 г. прекращена фаза III MARGIT-опыта в отношении NSCL (NCT00480025). Несмотря на указанные очень неутешительные результаты клинических исследований вакцины на основе белков безусловно обладают многими преимуществами.

Терапевтическую противораковую вакцину вводят страдающим раком пациентам для усиления способности их иммунной системы распознавать и уничтожать раковые клетки. Основной целью подхода на основе терапевтической противораковой вакцины является создание Т-клеток-киллеров (которые обозначат также как цитотоксические Т-лимфоциты), специфических для опухолевых клеток. Для этого а также для достижения сильного иммунного ответа вакцина должна содержать молекулы, называемые антигенами, которые также присутствуют в опухоли и которые требуется доставлять к антигенпрезентирующим клеткам (APC), прежде всего дендритным клеткам (DC), для инициации противоракового иммунитета. DC процессируют эти опухолевые антигены в небольшие пептиды, которые презентуются на поверхности клеток, экспрессирующих молекулы ГКГС класса I или ГКГС класса II, Т-клеткам. Пептиды, которые затем распознаются Т-клетками и тем самым индуцируют их стимуляцию, называются эпитопами. Презентация молекулами ГКГС класса I и ГКГС класса II обеспечивает активацию двух классов Т-клеток, цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов (CTL) и хелперных CD4⁺-Т-клеток (T_H) соответственно. Кроме того, для полной активации помимо распознающих антиген Т-клеток требуется второй сигнал, костимуляторный сигнал, который представлен неспецифическим антигеном и образуется в результате взаимодействия между костимуляторными молекулами, экспрессируемыми на поверхности APC, и Т-клеткой. Таким образом, двумя основными требованиями, предъявляемыми к эффективной терапевтической противораковой вакцине, является специфичность опухолевых антигенов и способность эффективно доставлять их к DC.

Таким образом, в совокупности для индукции опухолеспецифического иммунного ответа требуется три основные стадии: (I) антиген должен быть доставлен к дендритным клеткам, которые должны процессировать его до эпитопов, (II) дендритные клетки должны получать соответствующий активирующий сигнал и (III) активированные загруженные опухолевым антигеном дендритные клетки должны генерировать опосредуемые Т-клетками иммунные ответы в лимфоидных органах.

Поскольку опухолевые клетки могут ускользать от надзора иммунной системы с помощью понижающей регуляции экспрессии индивидуальных антигенов (пассивное ускользание от иммунологического надзора), то доставка имеющего несколько эпитопов антигена (полиэпитопный антиген) должна обеспечивать преимущество. Так, вакцины на основе белков позволяют полиэпитопному антигену доставляться к антигенпрезентирующим клеткам (APC), таким как дендритные клетки (DC), без ограничения, обусловленного единичным аллелем ГКГС. Другим путем усиления является долговременная презентация эпитопа, описанная в настоящее время для дендритных клеток, загруженных белками (van Montfoort N., Camps M.G., Khan S., Filippov D.V., Weterings J.J., Griffith J.M. и др., Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(16), 2009, сс. 6730-6735). Кроме того, белки, для которых требуется их поглощение и процессирование DC для достижения ГКГС, ограничено презентуют присутствующие в них эпитопы. Это снижает риск индукции периферической толерантности, которая обнаружена после вакцинации короткими пептидами, которые не обладают такими строгими требованиями к процессированию (Toes R.E., Offringa R., Blom R.J., Melief C.J., Kast W.M., Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(15), 1996, сс. 7855-7860).

Однако большинство растворимых белков, как правило, расщепляются в эндолизосомах и слабо перекрестно презентуются на молекулах ГКГС класса I и поэтому обладают слабой иммуногенностью в отношении CD8⁺-Т-клеточных ответов (Rosalia R.A., Quakkelaar E.D., Redeker A., Khan S., Camps M., Drijfhout J.W. и др., Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European journal of immunology* 43(10), 2013, сс. 2554-2565). Кроме того, хотя зрелые DC являются более эффективными, чем незрелые DC, в отношении примирования и вызывания Т-клеточных ответов (Apetoh L., Locher C., Ghiringhelli F., Kroemer G., Zitvogel L., Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin. Immunol.* 23, 2011, сс. 42-49), они утрачивают способность эффективно поглощать экзогенные антигены, в частности антигены, ограниченные (рестриктированные) по ГКГС класса II (Banchereau J., Steinman R.M., Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 1998, сс. 245-252). В результате, на обработанные в импульсном режиме пептидами DC в качестве вакцины накладывается несколько ограничений. Например, расщепление пептидов, быстрый круговорот молекул ГКГС класса I и диссоциация пептида из молекул ГКГС класса I в процессе получения и инъекция DC/пептидов может приводить к короткому времени полужизни комплексов ГКГС класса I/пептид на поверхности DC, что приводит к слабым Т-клеточным ответам.

Для повышения эффективности доставки вакцины на основе белка предложено применение прони-

кающих в клетку пептидов для внутриклеточной доставки раковых пептидов в DC (Wang R.F., Wang H.Y., Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 2002, сс. 149-156). Проникающие в клетку пептиды (CPP) представляют собой пептиды, состоящие из 8-40 остатков, которые обладают способностью пересекать клеточную мембрану и проникать в большинство типов клеток (Copolovici D.M., Langel K., Eriste E., Langel U., Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS nano* 8(3), 2014, сс. 1972-1994, Milletti F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today*, 2012). Альтернативно этому, их обозначают также как домен трансдукции белка (PTD), что отражает их источник в виде встречающихся в естественных условиях белков. Несколько эффективных CPP идентифицировано из белков, включая белок Tat вируса иммунодефицита человека, белок VP22 вируса герпеса простого и фактор роста фибробластов (Berry C.C. Intracellular delivery of nanoparticles via the HIV-1 tat peptide. *Nanomedicine*. 3, 2008, сс. 357-365; Deshayes S., Morris M.C., Divita G., Heitz F., Cell-penetrating peptides: Tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2005, сс. 1839-1849; Edenhofer F. Protein transduction revisited: Novel insights into the mechanism underlying intracellular delivery of proteins. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2008, сс. 3628-3636; Gupta B., Levchenko T.S., Torchilin V.P., Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2005, сс. 637-651; Torchilin V.P., Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 2006, сс. 343-375). Установлено, что Т-клеточная активность, обусловленная DC/TAT-TRP2, оказалась в 3-10 раз выше, чем индуцированная DC/TRP2 (Wang H.Y., Fu T., Wang G., Gang Z., Donna M.P.L., Yang J.C., Restifo N.P., Hwu P., Wang R.F., Induction of CD4⁺ T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 109, 2002a, сс. 1463-1470).

Кроме того, субъединичные вакцины (пептиды или белки) обладают слабой иммуногенностью. Поэтому с точки зрения терапевтической противораковой вакцины для них обязательным требованием является добавление в вакцину эффективного адьюванта для повышения уровня костимуляторных молекул на DC и, следовательно, для усиления ответа иммунной системы на антигены-мишени. Адьюванты решают эту задачу, имитируя сохраненные микробные компоненты, которые в естественных условиях распознаются иммунной системой. Они включают липополисахарид (LPS), компоненты оболочек бактериальных клеток и нуклеиновые кислоты, такие как двухцепочечная РНК (dsРНК) и одноцепочечная РНК (ssРНК), и ДНК, содержащую неметилированный CpG-динуклеотид. Их присутствие в сочетании с вакциной может значительно повышать врожденный иммунный ответ на антиген. Кроме того, указанный адьювант может усиливать скорее адаптивный иммунный ответ, связанный с CTL и типом поляризованных Th1, чем гуморальный иммунный ответ, приводящий к выработке антител. Изучены различные адьюванты, из них для применения на человеке одобрено лишь ограниченное количество. Они включают квасцы, MPL (монофосфарил-липид А) и ASO₄ (квасцы и MPL), применяемые в США, и MF59 (эмульсия масло-в-воде), ASO₄, липосомы, применяемые в Европе (Lim Y.T., Vaccine adjuvant materials for cancer immunotherapy and control of infectious disease. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 4(1), 2015, сс. 54-58).

В настоящее время в качестве многообещающего класса адьювантов рассматриваются лиганды Толл-подобного рецептора (TLR) (Baxevanis C.N., I.F. Voutsas и O.E. Tsitsilonis, Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. *Immunotherapy*, 5(5), 2013, сс. 497-511). Так, в важных исследованиях, направленных на развитие противораковых вакцин, в композиции вакцин включали различные агонисты TLR, такие как TLR-3 (поли I:C), TLR-4 (монофосфорил-липид А; MPL), TLR-5 (флагеллин), TLR-7 (имиквимод) и TLR-9 (CpG) (Duthie M.S., Windish H.P., Fox C.B., Reed S.G., Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol. Rev.* 239, 2011, сс. 178-196). Типы сигналов и цитокинов, продуцируемых иммунными клетками после стимуляции TLR, контролируют дифференцировку CD4⁺-Т-клеток в Th1, Th2, Th17 и Treg клетки. Стимуляция иммунных клеток, таких как DC и Т-клетки, большинством адьювантов на основе TLR приводит к выработке провоспалительных цитокинов и усиливает ответы Th1 CD8⁺-Т-клеток (Manicassamy S., Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol.* 21, 2009, сс. 185-193).

Конъюгация вакцин с лигандом TLR представляет собой привлекательный подход, который обладает несколькими преимуществами по сравнению с неконъюгированными вакцинами, включая (I) предпочтительное поглощение иммунными клетками, экспрессирующими TLR, (II) повышенный иммунный ответ и (III) пониженный риск индукции периферической толерантности. Фактически, все антигенпрезентирующие клетки, загруженные антигеном, должны одновременно активироваться. Различные группы исследователей, изучавшие этот подход с использованием различных лигандов TLR, главным образом связывали их химическим путем с вакциной на основе пептида или белка (Zom G.G., Khan S., Filipov D.V., Ossendorp F., TLR ligand-peptide conjugate vaccines: toward clinical application. *Adv. Immunol.* 114, 2012, сс. 177-201). Поскольку химическое связывание с пептидом легко осуществлять, то наиболее изученные лиганды TLR, предназначенные для конъюгации с вакциной, представляли собой агонисты TLR2 Pam2Cys и Pam3Cys (Fujita Y. и H. Taguchi, Overview and outlook of Toll-like receptor ligand-antigen conjugate vaccines. *Ther. Deliv.* 3(6), 2012, сс.749-760).

Однако установлено, что большинство изученных к настоящему времени противораковых вакцин обладают ограниченной эффективностью. Одним из объяснений этого является отсутствие терапии, с

помощью которой можно одновременно (I) стимулировать опосредуемый цитотоксическими полиэпитопными Т-клетками иммунитет, (II) индуцировать Т_h-клетки и (III) повышать иммунологическую память. Эти три параметра являются существенными для создания эффективного длительного противоопухолевого иммунитета. Так, CTL, специфические в отношении различных эпитопов, могут обеспечивать деструкцию многих раковых клеток в гетерогенной опухолевой массе и избегания увеличения вариантов без антигена (ускользание опухоли от иммунологического надзора). Т_h-клетки участвуют в поддержании длительного клеточного иммунитета, и инфильтрация опухолей Т_h-клетками также является важной стадией рекрутмента и функции CD8⁺-CTL. Иммунологическая память является важной для защиты от рецидива опухоли.

В свете вышесказанного, в основу настоящего изобретения была положена задача преодолеть указанные выше недостатки современных противораковых вакцин и разработать для применения в противораковой иммунотерапии новый комплекс, представляющий собой более эффективную вакцину, прежде всего противораковую вакцину, которая обладает улучшенной противоопухолевой активностью.

Эта цель достигается с помощью изложенного ниже объекта изобретения и прилагаемой формулы изобретения.

Хотя настоящее изобретение описано подробно ниже, должно быть очевидно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами и реагентами, указанными в настоящем описании, и они могут варьироваться. Также должно быть очевидно, что применяемая в контексте описания терминология не направлена на ограничение объема настоящего изобретения, который определяется только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, то все технические и научные понятия, применяемые в контексте настоящего описания, имеют значения, общепринятые и очевидные обычному специалисту в данной области.

Ниже описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены с помощью конкретных вариантов осуществления изобретения, однако следует понимать, что их можно объединять любым образом и в любом количестве с созданием дополнительных вариантов осуществления изобретения. Различные описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления изобретения не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения, они предназначены только для пояснения описанных вариантов осуществления изобретения. Должно быть очевидно, что настоящее описание предназначено для подтверждения вариантов осуществления изобретения и включает варианты осуществления изобретения, которые поясняют описанные варианты осуществления изобретения с любым количеством описанных и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех указанных элементов в настоящем описании, должны рассматриваться как подпадающие под объем настоящего описания, если из контекста не следует иное.

В настоящем описании и в представленной ниже формуле изобретения, если из контекста не требуется иное, понятие "содержат" и его грамматические формы, такие как "содержит" и "содержащий", следует рассматривать как включающие указанного представителя, указанное целое число или указанную стадию, но не исключающие любого другого не указанного представителя, указанное целое число или указанную стадию. Понятие "состоят из" является конкретным вариантом понятия "содержат", при этом исключается любой другой неуказанный представитель, неуказанное целое число или неуказанная стадия. В контексте настоящего изобретения понятие "содержат" включает понятие "состоят из". Таким образом, под понятие "содержащий" подпадает также "включающий", а также "состоящий", например композиция, "содержащая" X может содержать только X или может иногда включать дополнительный элемент, например, X + Y.

Упоминание в контексте настоящего описания понятия в единственном числе относится также и к множественному числу (особенно в контексте формулы изобретения), если в настоящем описании не указано иное или это явно противоречит контексту. Упоминание диапазонов величин в контексте настоящего описания должно служить только в качестве метода сокращенной ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, подпадающую под диапазон. Если специально не указано иное, то каждое индивидуальное значение включено в описание как если бы оно было индивидуально указано в настоящем описании. Спецификация не ограничена никаким языком, применяемым для указания не заявляемого элемента, важного для воплощения изобретения на практике.

Понятие "практически" не исключает "полностью", например композиция, "практически свободная" от Y, может представлять собой композицию полностью свободную от Y. При необходимости понятие "практически" можно опускать в описании изобретения.

Понятие "примерно" касательно численного значения x обозначает $x \pm 10\%$.

Комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении.

Первым объектом настоящего изобретения является комплекс, содержащий:

- а) проникающий в клетку пептид;
- б) по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп; и
- в) по меньшей мере один пептидный агонист TLR,

в котором компоненты а)-в), т.е. проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп и по меньшей мере один пептидный агонист TLR, ковалентно связаны.

Указанный предлагаемый в настоящем изобретении комплекс одновременно обеспечивает (I) стимуляцию опосредуемого полиэпитопной цитотоксической Т-клеткой иммунитета, (II) индукцию Т_h-клеток и (III) усиление иммунологической памяти. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой эффективную вакцину, в частности, с улучшенной противоопухолевой активностью.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой полипептид или белок, в частности рекомбинантный полипептид или рекомбинантный белок, предпочтительно рекомбинантный слитый белок или рекомбинантный слитый полипептид. Понятие "рекомбинантный" в контексте настоящего описания обозначает, что субстанция (в настоящем описании полипептид или белок) не встречается в естественных условиях. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который представляет собой рекомбинантный полипептид или рекомбинантный белок, как правило, содержит компоненты а)-в), в котором компоненты а)-в) имеют различное происхождение, т.е. не встречаются в естественных условиях в такой комбинации.

В контексте настоящего изобретения, т.е. в контексте настоящего описания, понятия "пептид", "полипептид", "белок" и вариации этих понятий относятся к пептиду, олигопептиду, олигомеру или белку, включая слитый белок, соответственно, содержащему по меньшей мере две аминокислоты, сцепленные друг с другом предпочтительно с помощью обычной пептидной связи, или альтернативно этому, с помощью модифицированной пептидной связи, такой, например, как связь в изостерических пептидах. Пептид, полипептид или белок может состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот. Предпочтительно пептид, полипептид или белок либо (полностью) состоит из L-аминокислот, либо (полностью) состоит из D-аминокислот, образуя тем самым "ретро-инвертированные пептидные последовательности". Понятие "ретро-инвертированные (пептидные) последовательности" относится к изомеру линейной пептидной последовательности, в которой направление последовательности является обратным (реверсированным) и хиральность каждого аминокислотного остатка является изменена на противоположную (инвертированной) (см., например, Jameson и др., *Nature*, 368, 1994, сс. 744-746; Brady др., *Nature*, 368, 1994, сс. 692-693). В частности, понятия "пептид", "полипептид", "белок" включают также "пептидомиметики", которые обозначают пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, указанные пептиды обладают способностью имитировать или антагонизировать биологическое(ие) действие(я) встречающегося в естественных условиях родительского пептида. У пептидомиметика отсутствуют классические характеристики пептида, такие как расщепляемые ферментами пептидные связи. В частности, пептид, полипептид или белок может содержать аминокислоты, отличные от тех 20 аминокислот, которые определяются генетическим кодом, в дополнение к указанным аминокислотам, или он может состоять из аминокислот, отличных от тех 20 аминокислот, которые определяются генетическим кодом. В частности, в контексте настоящего изобретения пептид, полипептид или белок может также состоять из аминокислот, модифицированных с помощью естественных процессов, таких как процессы посттрансляционного созревания, или с помощью химических процессов, которые хорошо известны специалисту в данной области. Такие модификации подробно описаны в литературе. Эти модификации могут затрагивать любую область полипептида: пептидный скелет, аминокислотную цепь или даже карбокси- или аминоконцы. В частности, пептид или полипептид может быть разветвлен в результате убиквитинизации или может быть циклическим с разветвлением или без разветвления. Такой тип модификации может являться результатом естественных или синтетических посттрансляционных процессов, которые хорошо известны специалисту в данной области. Понятия "пептид", "полипептид", "белок" в контексте настоящего изобретения включают, в частности, также модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, модификации пептида, полипептида или белка могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное связывание с нуклеотидом или нуклеотидным производным, ковалентное связывание с липидом или липидным производным, ковалентное связывание с фосфатидилинозитом, ковалентное или нековалентное перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, гликозилирование, включая пэгилирование, гидроксиглирование, йодизацию, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, сенеолоилирование, сульфатирование, присоединение аминокислот, такое как аргинилирование, или убиквитинизацию. Указанные модификации подробно описаны в литературе (*Proteins Structure and Molecular Properties*, 2-е изд., под ред. Т.Е. Creighton, New York, 1993; *Post-translational Covalent Modifications of Proteins*, под ред. В.С. Johnson, изд-во Academic Press, New York, 1983; Seifiter и др., *Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors*, *Meth. Enzymol.* 182, 1990, сс. 626-646, и Rattan и др., *Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 663, 1992, сс. 48-62). Таким образом, понятия "пептид", "полипептид", "белок" предпочтительно включают, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т.п.

Однако в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой "классический" пептид, полипептид или белок, где "классический" пептид, полипептид или белок, как правило, состоит из аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, которые сцеплены друг с другом с помощью обычной пептидной связи.

Если комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой полипептид или белок, то предпочтительно он содержит по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, более предпочтительно по меньшей мере 100, по меньшей мере 110, еще более предпочтительно по меньшей мере 120, по меньшей мере 130, наиболее предпочтительно по меньшей мере 140 или наиболее предпочтительно по меньшей мере 150 аминокислотных остатков.

Компонент а) - проникающий в клетку пептид.

СРР позволяет эффективно доставлять, т.е. транспортировать и загружать, в частности, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп в антигенпрезентирующие клетки (АРС), в частности в дендритные клетки (DC), что в результате обеспечивает механизм процессирования дендритными клетками антигена.

Понятие "проникающие в клетку пептиды" ("СРР"), как правило, применяют для обозначения коротких пептидов, которые обладают способностью транспортировать различные типы карго-молекул ("полезный груз") через плазматическую мембрану и в результате облегчать поглощение клетками различных карго-молекул (от наночастиц до небольших химических молекул и крупных фрагментов ДНК). "Клеточная интернализация" карго-молекул, связанных с проникающим в клетку пептидом, как правило, означает транспорт карго-молекулы через плазматическую мембрану и проникновение таким образом карго-молекулы в клетку. Затем в зависимости от конкретных обстоятельств карго-молекула может высвободиться в цитоплазму, направляться к внутриклеточной органелле или также презентироваться на клеточной поверхности. Способность проникать в клетку или интернализация проникающего в клетку пептида или комплекса, содержащего указанный проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, можно оценивать стандартными методами, известными специалисту в данной области, включая проточную цитометрию или флуоресцентную микроскопию живых и фиксированных клеток, иммуноцитохимию клеток, трансдуцированных указанным пептидом или комплексом, и Вестерн-блоттинг.

Проникающие в клетку пептиды, как правило, имеют аминокислотную композицию, которая либо содержит в относительно высоком количестве положительно заряженные аминокислоты, такие как лизин или аргинин, либо имеют последовательность, которая содержит чередующуюся схему расположения полярных/заряженных аминокислот и неполярных, гидрофобных аминокислот. Указанные два типа структур обозначают как поликатионные или амфипатические соответственно. Проникающие в клетку пептиды имеют различные размер, аминокислотные последовательности и заряды, но все СРР обладают общим свойством, представляющим собой способность к транслокации через плазматическую мембрану и облегчение доставки различных карго-молекул в цитоплазму или в органеллу клетки. В настоящее время теории транслокации СРР основаны на трех основных механизмах проникновения: непосредственное прохождение через мембрану, опосредуемое эндоцитозом проникновение и транслокация посредством образования транзитной структуры. Трансдукция СРР относится к области дальнейшего исследования. Известно, что проникающие в клетку пептиды нашли многочисленные применения в медицине в качестве агентов, доставляющих лекарственные средства, при лечении различных заболеваний, включая рак, и ингибиторов вирусов, а также контрастных агентов для мечения и визуализации клеток.

Как правило, проникающие в клетку пептиды (СРР) представляют собой пептиды, состоящие из 8-50 остатков, которые обладают способностью пересекать клеточную мембрану и проникать в большинство клеточных типов. Альтернативно этому, их обозначают также как домен трансдукции белка (PTD), что отражает их источник в виде встречающихся в естественных условиях белков. Frankel и Pabo одновременно с Green и Lowenstein описали способность транс-активирующего активатора транскрипции из вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-TAT) проникать в клетки (Frankel A.D. и соавт., Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1988, сс. 1189-1193). В 1991 г. описана трансдукция в нервные клетки гомеодомена Antennapedia (ДНК-связывающий домен) из *Drosophila melanogaster* (Joliot A. и др., Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(5), 1991, сс. 1864-1868). В 1994 г. охарактеризован первый 16-мерный пептид СРР, обозначенный как пенетратин, который имеет аминокислотную последовательность RQIKI-YFQNRMMKWKK (SEQ ID NO: 1), из третьей спирали гомеодомена Antennapedia (Derossi D. и др., The third helix of the Antennapedia гомеодомен translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269(14), 1994, сс. 10444-10450), после чего в 1998 г. идентифицирован минимальный домен TAT, имеющий аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), необходимый для трансдукции белков (Vives E., P. Brodin и B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.*, 272(25), 1997, сс. 16010-16017). В течение двух последних десятилетий описано множество пептидов различного происхождения, включая вирусные белки, например VP22 (Elliott G. и P. O'Hare, Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 88(2), 1997, сс. p. 223-233) и белок ZEBRA (Rothe R. и др., Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J. Biol. Chem.*, 285(26), 2010, сс. 20224-20233), или из ядов, например, мелиттин (Dempsey C.E., The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1031(2), 1990, сс. 143-161), мастопоран (Konno K. и др., Structure and biological activities of eumenin mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, 38(11), 2000, сс.

1505-1515), маурокальцин (Esteve E. и др., Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 280(13), 2005, сс. 12833-12839), кротамин (Nascimento F.D. и др., Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 282(29), 2007, сс. 21349-21360) или буфорин (Kobayashi S. и др., Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry*, 43(49), 2004, сс. 15610-15616). Созданы также синтетические CPP, включая полиаргинин (R8, R9, R10 и R12) (Futaki S. и др., Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.*, 276(8), 2001, сс. 5836-5840) или транспортан (Pooga M. и др., Cell penetration by transportan. *FASEB J.*, 12(1), 1998, сс. 67-77). Любые из описанных выше CPP можно применять в качестве проникающего в клетку пептида, т.е. компонента а), в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении. В частности, компонент а), т.е. CPP, в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, может содержать минимальный домен ТАТ, имеющий аминокислотную последовательность YGRK-KRRQRRR (SEQ ID NO: 2). В частности, компонент а), т.е. CPP, в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, может содержать пенетратин, который имеет аминокислотную последовательность RQIKIYFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 1).

Различные CPP, которые можно использовать в качестве проникающего в клетку пептида, т.е. компонента а), в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, описаны также в обзоре Milletti F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17, (15-16), 2012, сс. 850-860). Другими словами, CPP, описанные у Milletti F., Cell-penetrating: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860, можно применять в качестве проникающего в клетку пептида, т.е. компонента а), в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении. Они включают, в частности, катионные CPP, амфипатические CPP и гидрофобные CPP, а также CPP, полученные из гепаран-, РНК- и ДНК-связывающих белков, (см. табл. 1 у Millett, F., Cell-penetrating peptides penetrating: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860), CPP, полученные из сигнальных пептидов (см. таблицу у Millett, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860), CPP, полученные из антимикробных пептидов (см. табл. 3 у Millett, F., Cell-penetrating peptides penetrating: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860), CPP, полученные из вирусных белков (см. табл. 4 у Millett, F., Cell-penetrating peptides penetrating: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860), CPP, полученные из различных природных белков (см. табл. 5 у Millett, F., Cell-penetrating peptides penetrating: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860), а также сконструированные CPP и CPP, полученные из пептидных библиотек (см. табл. 6 у Millett, F., Cell-penetrating peptides penetrating: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17 (15-16), 2012, сс. 850-860).

Предпочтительно проникающий в клетку пептид, который содержится в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении:

I) имеет длину аминокислотной последовательности указанного пептида, составляющую в целом 5-50 аминокислот, предпочтительно в целом 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом 15-45 аминокислот; и/или

II) имеет аминокислотную последовательность, содержащую минимальный домен белка ZEBRA, где указанный минимальный домен простирается от остатка 170 до остатка 220 аминокислотной последовательности ZEBRA,

представленной в SEQ ID NO: 3, в которой необязательно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, или вариант последовательности указанного фрагмента.

Таким образом, проникающий в клетку пептид, который входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно:

I) имеет длину аминокислотной последовательности указанного пептида, составляющую в целом 5-50 аминокислот, предпочтительно в целом 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом 15-45 аминокислот; и

II) имеет аминокислотную последовательность, содержащую минимальный домен белка ZEBRA, где указанный минимальный домен простирается от остатка 170 до остатка 220 аминокислотной последовательности ZEBRA, представленной в SEQ ID NO: 3, в которой необязательно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, или вариант последовательности указанного фрагмента.

Указанные предпочтительные CPP описаны в WO 2014/041505.

Понятие "ZEBRA" (которое имеет также обозначения Zta, Z, EB 1 или BZLF1), как правило, обозначает основанный на лейциновой молнии (bZIP) активатор транскрипции вируса Эпштейна-Барра (EBV). Минимальный домен ZEBRA, который обладает способностью проникать в клетку, идентифицирован в виде домена, простирающегося от остатка 170 до остатка 220 ZEBRA. Аминокислотная последовательность ZEBRA представлена в NCBI, код доступа UP_401673, и содержит 245 аминокислотных остатков, указанных в SEQ ID NO: 3:

MMDPNSTSEDVKFTDPDYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLW
 PVLPEPLPQGQLTAYHVSTAPRTGSWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQN
 QQTNQAGGEPQPQGDNSTVQATAAVVFCPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAP
 ARRTRKPPQESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSS
 ENDRRLRLLKQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF

(SEQ ID NO: 3 - аминокислотная последовательность ZEBRA (встречающаяся в естественных условиях последовательность из вируса Эпштейна-Барра (EBV)) (YP_401673)).

В настоящее время описано, что CPP из вирусного белка ZEBRA трансдуцирует карго-белки через биологические мембраны как путем (I) непосредственной транслокации, так и путем (II) опосредуемого липидным рафтом (плотом) эндоцитоза (Rothe R., Liguori L., Villegas-Mendez A., Marques B., Grunwald D., Drouet E. и др. Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. The Journal of biological chemistry 285(26), 2010, сс. 20224-20233). При создании настоящего изобретения высказано предположение о том, что эти два механизма проникновения должны усиливать ограниченную по ГКГС класса I и II презентацию карго-антигенов как CD8⁺, так и CD4⁺-Т-клеткам соответственно. Таким образом, указанный CPP может доставлять полиэпителиальные пептиды к дендритным клеткам (DC) и затем усиливать активацию CTL и Th-клеток и противоопухолевую функцию. Таким образом, указанный CPP может эффективно доставлять комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, к антигенпрезентирующим клеткам (APC) и приводить к ограниченной по ГКГС класса I и II презентации полиэпителиальных антигенов.

В контексте настоящего изобретения понятие "ГКГС класса I" обозначает один из двух основных классов молекул главного комплекса гистосовместимости. Молекулы ГКГС класса I (которые обозначают также как "ГКГС I") обнаружены на каждой имеющей ядро клетке организма. Функция ГКГС класса I состоит в презентации эпитопа цитотоксическим клеткам (CTL). У людей молекулы ГКГС класса I состоят из двух полипептидных цепей, α- и β2-микроглобулина (b2m). Только α-цепь является полиморфной и кодируется геном HLA, а b2m-субъединица не является полиморфной и кодируется геном β2 микроглобулина. В контексте настоящего изобретения понятие "ГКГС класса II" означает другой основной класс молекул главного комплекса гистосовместимости. Молекулы ГКГС класса II (которые обозначают также как ГКГС II") обнаружены только в небольшом количестве специализированных клеточных типов, включая макрофаги, дендритные клетки и В-клетки, которые все относятся к антигенпрезентирующим клеткам (APC).

Предпочтительно последовательности варианта фрагмента минимального домена ZEBRA, описанного выше, характеризуется, в частности, по всей длине, идентичностью аминокислотной последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, с аминокислотной последовательностью фрагмента минимального домена ZEBRA, описанного выше, без аннулирования способности проникающего в клетку пептида проникать в клетку. В частности, под "фрагментом" минимального домена ZEBRA, описанного выше, предпочтительно подразумевается его укороченная последовательность, т.е. аминокислотная последовательность, укороченная на N-конце, C-конце и/или внутри последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью нативной последовательности. Кроме того, указанный "фрагмент" минимального домена ZEBRA предпочтительно в целом состоит из 5-50 аминокислот, предпочтительно в целом состоит из 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом состоит из 15-45 аминокислот.

Таким образом, понятие "вариант последовательности" в контексте настоящего изобретения, т.е. в настоящем описании, относится к любому изменению в референс-последовательности. Понятие "вариант последовательности" включает варианты нуклеотидной последовательности и варианты аминокислотной последовательности. Предпочтительно референс-последовательность представляет собой любую из последовательностей, указанную в "Таблице последовательностей и номеров SEQ ID" (Перечень последовательностей), т.е. SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 79. Предпочтительно вариант последовательности характеризуется, в частности по всей длине последовательности, идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%, с референс-последовательностью, где идентичность последовательности рассчитывают указанным ниже методом. В частности, вариант последовательности сохраняет специфическую функцию референс-последовательности. Идентичность последовательности рассчитывают с помощью описанного ниже метода. В частности, вариант аминокислотной последовательности имеет измененную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот в референс-последовательности удалена или заменена, или одна или несколько аминокислот встроены в последовательность аминокислотной референс-последовательности.

В результате изменений вариант аминокислотной последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99%, идентична референс-последовательности. Например, варианты последовательностей, идентичные по меньшей мере на 90%, имеют не более 10 изменений, т.е. любую комбинацию делеций, инсерций или замен, на 100 аминокислот референс-последовательности.

В контексте настоящего изобретения подразумевается, что аминокислотная последовательность "характеризуется идентичностью последовательности", составляющей по меньшей мере, например, 95% с запрашиваемой аминокислотной последовательностью, предлагаемой в настоящем изобретении, означает, что последовательность рассматриваемой аминокислотной последовательности идентична запрашиваемой последовательности за исключением того, что рассматриваемая аминокислотная последовательность может включать вплоть до 5 аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот запрашиваемой аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения аминокислотной последовательности, имеющей последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% запрашиваемой аминокислотной последовательности, вплоть до 5% (5 из 100) аминокислотных остатков в рассматриваемой последовательности можно встраивать или заменять на другую аминокислоту или изымать путем делеций, предпочтительно в соответствии с приведенными выше определениями вариантов или фрагментов. Это же, естественно, применимо также к сходству нуклеотидных последовательностей.

Для (аминокислотных или нуклеотидных) последовательностей, не имеющих точного соответствия, "% идентичности" первой последовательности можно определять относительно второй последовательности. В целом, эти две последовательности, подлежащие сравнению, выравнивают для получения максимальной корреляции между последовательностями. Это может включать встраивание "брешей" в любую одну или обе последовательности для повышения степени выравнивания. Затем можно определять % идентичности по всей длине каждой из сравниваемых последовательностей (так называемое глобальное выравнивание), что наиболее пригодно для последовательностей одинаковой или сходной длины, или для более коротких определенных длин (так называемое локальное выравнивание), что наиболее пригодно для последовательностей неодинаковой длины.

Методы сравнения идентичности и гомологии двух или большего количества последовательностей хорошо известны в данной области. Процент идентичности двух последовательностей можно определять, например, с помощью математического алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять, является (но не ограничиваясь только ими) алгоритм, описанный у Karlin и др., PNAS USA, 90, 1993, сс. 5873-5877. Указанный алгоритм интегрирован в семейство программ BLAST, например, программу BLAST или NBLAST (см. также Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410 или Altschul и др., Nucleic Acids Res., 25, 1997, сс. 3389-3402), доступные через домашнюю страницу NCBI в Интернете (ncbi.nlm.nih.gov), и FASTA (Pearson, Methods Enzymol. 183, 1990, сс. 63-98; Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 85, 1988, сс. 2444-2448.). С помощью указанных программ можно идентифицировать последовательности, идентичные в определенной степени другим последовательностям. Кроме того, программы доступны в Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 9.1 (Devereux и др., Nucleic Acids Res., 1984, сс. 387-395), например, программы BESTFIT и GAP, которые можно применять для определения % идентичности между двумя полинуклеотидами и % идентичности и % гомологии или идентичности между двумя полипептидными последовательностями. В BESTFIT применяют алгоритм "локальной гомологии", предложенный Smith и Waterman, J. Mol. Biol. 147, 1981, сс. 195-197.), и этот алгоритм позволяет находить наилучшую единичную область сходства между двумя последовательностями.

Более предпочтительно фрагменты проникающего в клетку пептида, предлагаемого в изобретении, или их варианты, описанные выше, сохраняют также способность пептида презентировать карго-молекулу, такую как антигены или антигенные эпитопы на поверхности клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, в контексте молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II. Способность проникающего в клетку пептида или комплекса, содержащего указанный проникающий в клетку пептид, презентировать карго-молекулу, такую как антигены или антигенные эпитопы на поверхности клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, в контексте молекул ГКГС класса I и/или ГКГС класса II можно оценивать стандартными методами, известными специалисту в данной области, включая способность стимулировать пролиферацию и/или функцию ограниченных по ГКГС CD4⁺- или CD8⁺-Т-клеток со специфическими для них эпитопами.

Предпочтительный проникающий в клетку пептид, который:

I) имеет длину аминокислотной последовательности указанного пептида, составляющую в целом 5-50 аминокислот, предпочтительно в целом 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом 15-45 аминокислот; и/или

II) имеет аминокислотную последовательности, содержащую фрагмент минимального домена ZEBRA, где указанный минимальный домен простирается от остатка 170 до остатка 220 аминокислотной последовательности ZEBRA, представленной в SEQ ID NO: 3, в которой необязательно 1, 2, 3, 4 или 5

аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, или вариант указанного фрагмента, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену по сравнению с референс-последовательностью, это означает, что данный аминокислотный остаток заменен на остаток, имеющий сходные физико-химические характеристики.

Как правило, замены одной или нескольких аминокислот, присутствующих в аминокислотной референс-последовательности, должны представлять собой консервативные замены. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например замену друг на друга He, Val, Leu или Ala, или замены одного полярного остатка на другой, например замены между Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны и другие указанные консервативные замены, например замены полных областей, имеющих сходные гидрофобные свойства (Kyte и Doolittle, *IJ. Mol. Biol.* 157(1), 1982, сс. 105-132). Замены одной или нескольких L-аминокислот на одну или несколько D-аминокислот могут рассматриваться в качестве консервативных замен в контексте настоящего изобретения. Примеры аминокислотных замен представлены ниже в табл. 1.

Таблица 1

Исходные остатки	Примеры замен
Ala (A)	Val, Leu, Ile, Gly
Arg (R)	His, Lys
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, His
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Tyr, Trp, Met
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

Наиболее предпочтительно предпочтительный проникающий в клетку пептид, который:

I) имеет длину аминокислотной последовательности указанного пептида, составляющую в целом 5-50 аминокислот, предпочтительно в целом 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом 15-45 аминокислот; и/или

II) имеет аминокислотную последовательности, содержащую фрагмент минимального домена ZEBRA, где указанный минимальный домен простирается от остатка 170 до остатка 220 аминокислотной последовательности ZEBRA, представленной в SEQ ID NO: 3, в которой необязательно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, или вариант указанного фрагмента, содержит замену Cys (C) на Ser (S) в эквивалентном положении 189 в аминокислотной последовательности ZEBRA, представленной в SEQ ID NO: 3.

Таким образом, предпочтительно, чтобы указанный предпочтительный проникающий в клетку пептид имел аминокислотную последовательность, содержащую последовательность следующей общей формулы (I):



в которой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, в которой

X₁ обозначает K, R или H, предпочтительно X₁ обозначает K или R;

X₂ обозначает R, K или H, предпочтительно X₂ обозначает R или K;

X₃ обозначает Y, W или F, предпочтительно X₃ обозначает Y, W или F;

X₄ обозначает K, R или H, предпочтительно X₄ обозначает K или R;

X₅ обозначает N или Q;

X₆ обозначает R, K или H, предпочтительно X₆ обозначает R или K;

X₇ обозначает V, I, M, L, F или A, предпочтительно X₇ обозначает V, I, M или L;

X₈ обозначает A, V, L, I или G, предпочтительно X₈ обозначает A или G;

X₉ обозначает S или T;

X₁₀ обозначает R, K или H, предпочтительно X₁₀ обозначает R или K;
 X₁₁ обозначает K, R или H, предпочтительно X₁₁ обозначает K или R;
 X₁₃ обозначает R, K или H, предпочтительно X₁₃ обозначает R или K;
 X₁₄ обозначает A, V, L, I или G, предпочтительно X₁₄ обозначает A или G;
 X₁₅ обозначает K, R или H, предпочтительно X₁₅ обозначает K или R;
 X₁₆ обозначает F, L, V, I, Y, W или M, предпочтительно X₁₆ обозначает F, Y или W; и
 X₁₇ обозначает K, R или H, предпочтительно X₁₇ обозначает K или R.

Предпочтительно указанный пептид, полипептид или белок состоит либо (полностью) из L-аминокислот, либо (полностью) из D-аминокислот, образуя "ретро-инвертированные пептидные последовательности". Понятие "ретро-инвертированные (пептидные) последовательности" относится к изомеру линейной пептидной последовательности, в которой направление последовательности является обратным и хиральность каждого аминокислотного остатка изменена на противоположную (см., например, Jameson и др., Nature, 368, 1994, сс. 744-746; Brady др., Nature, 368, 1994, сс. 692-693).

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁ обозначает K.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₂ обозначает R.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₃ обозначает Y.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₄ обозначает K.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₅ обозначает N.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₆ обозначает R.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₇ обозначает V.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₈ обозначает A.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₉ обозначает S.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₀ обозначает R.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₁ обозначает K.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₃ обозначает R.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₄ обозначает A.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₅ обозначает K.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₆ обозначает F.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой X₁₇ обозначает K.

В конкретном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, как правило, описывается указанной выше общей формулой (I), в которой аминокислотный остаток в положении, эквивалентном положению 12 в общей формуле (I), представляет собой Ser (S).

Предпочтительно также предпочтительный проникающий в клетку пептид, который:

I) имеет длину аминокислотной последовательности указанного пептида, составляющую в целом 5-50 аминокислот, предпочтительно в целом 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом 15-45 аминокислот; и/или

II) имеет аминокислотную последовательности, содержащую фрагмент минимального домена ZEBRA, где указанный минимальный домен простирается от остатка 170 до остатка 220 аминокислотной последовательности ZEBRA, представленной в SEQ ID NO: 3, в которой необязательно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, или вариант указанного фрагмента,

содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4-13 или вариантов указанных последовательностей, не аннулирующих способность указанного пептида проникать в клетку, предпочтительно вариантов последовательности, в которой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку.

CPP1 (Z11):
KRYKNRVASRKCRKAKFKQLLQHYREVAATAKSSNDRLRLLLKQMC
(SEQ ID NO: 4)

CPP2 (Z12):
KRYKNRVASRKCRKAKFKQLLQHYREVAATAKSSNDRLRLLLK
(SEQ ID NO: 5)

CPP3 (Z13):
KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAATAKSSNDRLRLLLK
(SEQ ID NO: 6)

CPP4 (Z14):
KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAATAK
(SEQ ID NO: 7)

CPP5 (Z15):
KRYKNRVASRKSRAKFK
(SEQ ID NO: 8)

CPP6 (Z16):
QHYREVAATAKSSND
(SEQ ID NO: 9)

CPP7 (Z17):
QLLQHYREVAATAK
(SEQ ID NO: 10)

CPP8 (Z18):
REVAATAKSSNDRLRLLLK
(SEQ ID NO: 11)

CPP9 (Z19):
KRYKNRVA
(SEQ ID NO: 12)

CPP10 (Z20):
VASRKSRAKFK
(SEQ ID NO: 13)

Таким образом, особенно предпочтительным является проникающий в клетку пептид, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15) или SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), или варианты этой последовательности, не аннулирующие способность указанного пептида проникать в клетку, предпочтительно варианты последовательности, в которой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку. Кроме того, более предпочтительным является проникающий в клетку пептид, который имеет аминокислотную последовательность, со-

держашую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) или SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14) или вариантов указанной последовательности, не аннулирующих способность указанного пептида проникать в клетку, предпочтительно вариантов последовательности, в которой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку. Кроме того, наиболее предпочтительным является проникающий в клетку пептид, который имеет аминокислотную последовательность, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) или вариантов указанной последовательности, не аннулирующих способность указанного пептида проникать в клетку, предпочтительно вариантов последовательности, в которой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены путем делеции и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, имеет аминокислотную последовательность, которая содержит или состоит из SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, имеет аминокислотную последовательность, которая содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, имеет аминокислотную последовательность, которая содержит или состоит из SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, имеет аминокислотную последовательность, которая содержит или состоит из SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18).

Как должно быть очевидно специалисту в данной области, первичная аминокислотная последовательность проникающего в клетку пептида, предлагаемого в изобретении, может быть подвергнута дополнительной посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование или фосфорилирование, без отклонения от объема изобретения.

В следующем варианте осуществления изобретения проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, необязательно дополнительно содержит помимо его аминокислотной последовательности, описанной выше, любой из следующих компонентов или любую комбинацию следующих компонентов:

(I) сигнал ядерной локализации (NLS). Такие сигналы хорошо известны специалисту в данной области и описаны у Nair и др., *Nucleic Acids Res.* 31(1), 2003, сс. 397-399),

(II) нацеливающий (таргетирующий) пептид, включая пептиды хоминга опухолей, такие как описанные у Кароог и др., *PLoS ONE* 7(4), 2012, e35187) и перечисленные в [in-http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope/general.php](http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope/general.php)?

Предпочтительно проникающий в клетку пептид, предлагаемый в изобретении, связан с антигеном или антигенным эпитопом и облегчает клеточную интернализацию указанного антигена или антигенного эпитопа.

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать только один проникающий в клетку пептид или несколько проникающих в клетку пептидов. Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит не более пяти проникающих в клетку пептидов, более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит не более четырех проникающих в клетку пептидов, еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит не более трех проникающих в клетку пептидов, наиболее предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит не более двух проникающих в клетку пептидов и наиболее предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит только один проникающий в клетку пептид.

Компонент б) - антиген/антигенный эпитоп.

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит в качестве компонента б) по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп.

В контексте настоящего описания "антиген" представляет собой субстанцию любой структуры, которая служит в качестве мишени для рецепторов, участвующих в адаптивном иммунном ответе, в частности, в качестве мишени для антител, Т-клеточных рецепторов и/или В-клеточных рецепторов. "Эпитоп", который называют также "антигенной детерминантой", представляет собой часть (или фрагмент) антигена, которая распознается иммунной системой, в частности антителами, Т-клеточными рецепторами и/или В-клеточными рецепторами. Так, один антиген имеет по меньшей мере один эпитоп, т.е. один антиген имеет один или несколько эпитопов. В контексте настоящего изобретения понятие "эпитоп" главным образом применяют для обозначения Т-клеточных эпитопов, которые презентуются на поверхности антигенпрезентирующей клетки, где они связаны с главным комплексом гистосовместимости (ГКГС). Т-клеточные эпитопы, которые презентуются молекулами ГКГС класса I, как правило, но не всегда, представляют собой пептиды, состоящие из 8-11 аминокислот, в то время как молекулы ГКГС класса II презентуют более длинные пептиды, как правило, но не всегда, состоящие из 12-25 аминокислот.

Предпочтительно в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп выбран из группы, которая состоит из: (I) пептида, полипептида или белка, (II) полисахарида, (III) липида, (IV) липопротеина или липопептида, (V) гликолипида, (VI) нуклеиновой кислоты и (VII) низкомолекулярного лекарственного средства или токсина. Таким образом, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп может представлять собой пептид, белок, полисахарид, липид, их комбинацию, включающую липопротеины и гликолипиды, нуклеиновую кислоту (например, ДНК, siРНК, shРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, ДНК-ловушка, плаزمид), или низкомолекулярное лекарственное средство (например, циклоспорин А, паклитаксел, доксорубин, метотрексат, 5-аминолевулиновая кислота), или любую их комбинацию, в частности, если предлагаемый в изобретении комплекс содержит более одного антигена или антигенного эпитопа.

Очевидно, что по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп может содержать, например, по меньшей мере один, т.е. один или несколько пептидов, полипептидов или белков, связанных вместе, и/или по меньшей мере одну, т.е. одну или несколько нуклеиновых кислот, например, каждая из которых кодирует один пептид или полипептид. Кроме того, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп может представлять собой комбинацию белка, липида и/или полисахарида, включая липопротеины и гликолипиды. Так, в частности, если комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит более одного антигена или антигенного эпитопа, то он может содержать более одного пептида, полипептида или белка, более одного полисахарида, более одного липида, более одного липопротеина, более одного гликолипида, более одной нуклеиновой кислоты, более одного низкомолекулярного лекарственного средства или токсина, или их комбинацию.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в изобретении, содержит по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, содержащий один или несколько эпитоп(ов), выбранный(ых) из ассоциированного с раком/опухолью антигена, специфического для рака/опухоли антигена и/или антигенного белка из патогена, включая антигенный белок из вирусов, бактерий, грибов, простейших и многоклеточных паразитов.

Более предпочтительно по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп содержит или состоит из (I) по меньшей мере одного эпитопа патогена и/или (II) по меньшей мере из одного ракового/опухолевого эпитопа, в частности по меньшей мере из одного опухолевого эпитопа. Наиболее предпочтительно по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп содержит или состоит по меньшей мере из одного ракового/опухолевого эпитопа, в частности по меньшей мере из одного опухолевого эпитопа.

Наиболее предпочтительно, когда комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит только такой(ие) антиген(ы) или антигенный(ые) эпитоп(ы), который(ые) представляет(ют) собой ассоциированный(ые) с раком/опухолью антиген(ы), специфический(ие) для рака/опухоли антиген(ы) и/или раковый(ые)/опухолевый(ые) эпитоп(ы); в частности, представляющий(ие) собой ассоциированный(ые) с раком/опухолью антиген(ы), специфический(ие) для рака/опухоли антиген(ы) и/или раковый(ые)/опухолевый(ые) эпитоп(ы).

В контексте настоящего описания "раковый эпитоп" означает эпитоп из ассоциированного с раком антигена или из специфического для рака антигена. Соответственно "опухолевый эпитоп" означает эпитоп из ассоциированного с опухолью антигена или из специфического для опухоли антигена. Указанные эпитопы, как правило, являются специфическими (или ассоциированы) для определенного типа рака/опухоли. Например, раковые/опухолевые эпитопы включают эпитопы глиомы. В частности, ассоциированные с раком/опухолью (также связанные с раком/опухолью) антигены представляют собой антигены, которые экспрессируются как на раковых/опухолевых клетках, так и на здоровых клетках. Соответственно такие антигены в норме присутствуют с рождения (или даже до рождения). Соответственно существует шанс, что у иммунной системы разовьется самотолерантность к таким антигенам. В отличие от этого, специфические для рака/опухоли антигены представляют собой антигены, которые экспрессируются специфически раковыми/опухолевыми клетками, но не здоровыми клетками. Специфические для рака/опухоли антигены включают, в частности, неоантигены. В целом, неоантигены представляют собой антигены, которые не присутствовали ранее и поэтому являются "новыми" для иммунной системы. Неоантигены, как правило, являются результатом соматических мутаций. Касательно раковых/опухолевых, специфических для рака/опухоли неоантигенов, то они, как правило, не присутствуют до развития рака/опухоли и специфические для рака/опухоли неоантигены, как правило, кодируются соматическими генными мутациями в раковых клетках/опухолевых клетках. Поскольку неоантигены являются новыми для иммунной системы, то считается, что риск самотолерантности к этим антигенам является более низким, чем к ассоциированным с раком/опухолью антигенам. Однако каждый набор опухолеспецифических мутаций, вероятно, является уникальным. Соответственно в контексте настоящего изобретения предпочтительно, чтобы указанные специфические для рака/опухоли антигены, в частности неоантигены, были идентифицированы у индивидуума с диагностированным раком с помощью методов, известных специалисту в данной области, например, путем секвенирования ракового генома. После идентификации соответствующие специфические для рака/опухоли неоантигены и/или специфические для рака/опухоли эпитопы неоантигенов применяют в комплексе, предлагаемом в изобретении.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит один или несколько ассоциированных с раком/опухолью эпитопов и/или один или несколько ассоциированных с раком/опухолью антигенов (но предпочтительно не содержит специфические для рака/опухоли эпитопы). Предпочтительно также, чтобы комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержал один или несколько специфических для рака/опухоли эпитопов и/или один или несколько специфических для рака/опухоли антигенов (но предпочтительно не содержал ассоциированные с раком/опухолью эпитопы). Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно также предпочтительно содержать как (I) один или несколько ассоциированных с раком/опухолью эпитопов и/или один или несколько ассоциированных с раком/опухолью антигенов, так и (II) один или несколько специфических для рака/опухоли эпитопов и/или один или несколько специфических для рака/опухоли антигенов.

Приемлемые раковые/опухолевые эпитопы можно найти, например, в базах данных раковых/опухолевых эпитопов, например, у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun.* 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTI-GEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>). Примеры раковых/опухолевых эпитопов включают, например, полученные из TRP2-эпитопы, эпитопы антигена гликопротеина 100 (gp100), ассоциированного с меланомой, эпитопы антигена гликопротеина 70 (gp70), эпитопы сурвивина, IEa-эпитопы, IL13ra2, EphA2 (эфриновый рецептор 2 типа A), их иммуногенные фрагменты и слияния указанных антигенов и/или фрагментов. Кроме того, примеры раковых/опухолевых эпитопов включают эпитопы неоантигенов, таких, например, как неоантиген из опухолевых клеток линии MC-38, описанный у Yadav и др., *Nature*, 515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576. Как описано выше, неоантигены представляют собой антигены, которые полностью отсутствуют в геноме здорового человека. По сравнению с немутантными аутоантигенами неоантигены актуальные для контроля опухоли, поскольку на качество Т-клеточного пула, доступного для этих антигенов, не влияет центральная Т-клеточная толерантность. В частности, основой неоантигенов могут быть индивидуальные опухолевые геномы. Потенциальные неоантигены можно предсказывать методами, известными специалисту в данной области, такими как секвенирование ракового генома или технологии глубокого секвенирования, позволяющие идентифицировать мутации в кодирующей белок области (ракового) генома.

Конкретными примерами ассоциированных с раком/опухолью, в частности связанных с опухолью или тканеспецифических антигенов, которые можно применять в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, являются (но, не ограничиваясь только ими) следующие антигены: простатный специфический антиген (PSA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), PAP, PSCA (PNAS 95(4), 1998, сс. 1735-1740), антиген муцина простаты (PMA) (Beckett и Wright, *Int. J. Cancer* 62, 1995, сс. 703-710), простатаза, Her-2neu, SPAS-1; меланома: TRP-2, тирозиназа, Melan A/Mart-1, gp100, BAGE, GAGE, ганглиозид GM2; молочная железа: Her2-neu, кинезин 2, TATA-элемент модулирующего фактора 1, опухолевый белок D52, MAGE D, ING2, HIP-55, TGF-1 антиапоптозный фактор, NOM-Mel-40/SSX2, эпителиальный антиген (LEA 135), антиген DF31MUC1 (Apostolopoulos и др., *Immunol. Cell Biol.* 74, 1996, сс. 457-464; Pandey и др., *Cancer Res.* 55, 1995, сс. 4000-4003); яички: MAGE-1, NOM-Mel-40/SSX2, NY-ESO-1; ободочная кишка: EGFR, CEA; легкое: MAGE D, EGFR; яичник: Her-2neu; мочевой пузырь: переходо-клеточная карцинома (TCC) (Jones и др., *Anticancer Res.* 17, 1997, сс. 685-687), некоторые формы рака: EphA2, EphA4, PCDGF, HAAN, мезотелин; EPCAM; NY-ESO-1, гликопротеин MUC1 и муцины NIUC10 p5 (особенно мутантные версии), EGFR; смешанная опухоль: ассоциированный с раком сывороточный антиген (CASA) и раковый антиген 125 (CA 125) (Kierkegaard и др., *Gynecol. Oncol.* 59, 1995, сс. 251-254), эпителиальный гликопротеин 40 (EGP40) (Kievit и др., *Int. J. Cancer* 71, 1997, сс. 237-245), антиген плоскоклеточной карциномы (SCC) (Lozza и др., *Anticancer Res.* 17, 1997, сс. 525-529), каптепсин E (Mota и др., *Am. J. Pathol.* 150, 1997, сс. 1223-1229), тирозиназа в меланоме (Fishman и др., *Cancer* 79, 1997, сс. 1461-1464), ядерный антиген клеток (PCNA) церебральных каверном (Noflet и др., *Surg. Neurol.* 47, 1997, сс. 364-370), ассоциированный с опухолью аутоантиген 35 кД в папиллярной тиреоидной карциноме (Lucas и др., *Anticancer Res.* 16, 1996, сс. 2493-2496), CDC27 (включая мутантную форму белка), антигены триозофосфатизомеразы, 707-AP, микобактериальный антиген A60 (Macis и др., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 1996, сс. 296-300), аннексии II, AFP, ART-4, BAGE, β-катенин/m, BCL-2, bcr-abl, bcr-abl p190, bcr-abl p210, BRCA-1, BRCA-2, CA 19-9 (Tolliver и O'Brien, *South Med. J.* 90, 1997, сс. 89-90; Tsuruta и др., *Urol. Int.* 58, 1997, сс. 20-24), CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK-4/m, CEA (Huang и др., *Exper. Rev. Vaccines* 1, 2002, сс. 49-63), CT9, CT10, Cyp-B, Dek-cain, DAM-6 (MAGE-B2), DAM-10 (MAGE-B1), EphA2 (Zantek и др., *Cell Growth Differ.* 10, 1999, сс. 629-638; Carles-Kinch и др., *Cancer Res.* 62, 2002, сс. 2840-2847), EphA4 (Cheng и др., *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 2002, сс. 75-85), ассоциированный с опухолью антиген Томсена-Фриденрайха (Dahlenborg и др., *Int. J. Cancer* 70, 1997, сс. 63-71), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GnT-V, gp100 (Zajac и др., *Int. J. Cancer* 71, 1997, сс. 491-496), HAGE, HER2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, hTRT, iCE, ингибиторы апоптоза (например, сурвивин), антиген

аденокарциномы KH-1 (Deshpande и Danishefsky, Nature 387, 1997, сс. 164-166), KIAA0205, K-ras, LAGE, LAGE-1, LDLR/FUT, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE D, MART-1, MART-1/Melan-A (Kawakami и Rosenberg, Int. Rev. Immunol. 14, 1997, сс. 173-192), MC1R, MDM-2, миозин/m, MUC1, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, нео-полиА-полимераза, NA88-A, NY-ESO-1, NY-ESO-1a (CAG-3), PAGE-4, PAP, протеиназа 3 (Molldrem и др., B100d 88, 1996, сс. 2450-2457; Molldrem и др., Blood 90, 1997, сс. 2529-2534), P15, p190, Pml/RAR α , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RAS, RCAS1, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SP17, SPAS-1, TEL/AML1, TPI/m, тирозиназа, TARP, TRP-1 (gp75), TRP-2, TRP-2/INT2, WT-1 и альтернативно транслируемые белки NY-ESO-ORF2 и CAMEL, полученные из генов NY-ESO-1 и LAGE-1. В данной области хорошо известны многочисленные другие раковые антигены.

Предпочтительно раковый/опухолевый антиген или раковый/опухолевый эпитоп представляет собой рекомбинантный раковый/опухолевый антиген или рекомбинантный раковый/опухолевый эпитоп. Указанный рекомбинантный раковый/опухолевый антиген или рекомбинантный раковый/опухолевый эпитоп можно создавать путем интродукции мутаций, который изменяют (добавление, делеция или замена) конкретные аминокислоты во всей аминокислотной последовательности нативного ракового/опухолевого антигена или нативного ракового/опухолевого эпитопа. Интродукция мутаций не изменяет раковый/опухолевый антиген или раковый/опухолевый эпитоп столь сильно, чтобы его уже нельзя было применять в качестве универсального для видов млекопитающих и предпочтительно человека или собак, но изменяют его в достаточной степени, чтобы образовавшаяся аминокислотная последовательность нарушала толерантность или рассматривалась как чужеродный антиген для создания иммунного ответа. Другим путем может являться создание консенсусного рекомбинантного ракового/опухолевого антигена или ракового/опухолевого эпитопа, аминокислотная последовательность которого идентична по меньшей мере на 85% и вплоть до 99% последовательности соответствующего нативного ракового/опухолевого антигена или нативного ракового/опухолевого эпитопа; предпочтительно идентичность последовательности составляет по меньшей мере 90% и вплоть до 98% и; более предпочтительно идентичность последовательности составляет по меньшей мере 93% и вплоть до 98%; или еще более предпочтительно идентичность последовательности составляет по меньшей мере 95% и вплоть до 98%. В некоторых случаях аминокислотная последовательность рекомбинантного ракового/опухолевого антигена или рекомбинантного ракового/опухолевого эпитопа идентична на 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности соответствующего нативного ракового/опухолевого антигена или нативного ракового/опухолевого эпитопа. Нативный раковый/опухолевый антиген представляет собой антиген, ассоциированный в норме с конкретным раком или конкретной раковой опухолью. В зависимости от ракового/опухолевого антигена консенсусная последовательность ракового/опухолевого антигена может присутствовать в видах млекопитающих или в подтипах видов или вирусных штаммах или серотипах. Некоторые раковые/опухолевые антигены не отличаются значительно от аминокислотной последовательности дикого типа ракового/опухолевого антигена. Вышеописанные подходы можно объединять так, чтобы конечный рекомбинантный раковый/опухолевый антиген или раковый/опухолевый эпитоп имел указанный выше процент сходства с аминокислотной последовательностью нативного ракового антигена. Однако предпочтительно аминокислотная последовательность эпитопа ракового/опухолевого антигена, указанного в описании, не является мутантной и, следовательно, является идентичной референс-последовательности эпитопа.

В контексте настоящего описания понятие "эпитоп патогена" означает эпитоп антигенного белка, антигенного полисахарида, антигенного липида, антигенного липопротеина или антигенного гликолипида из патогена, включая вирусы, бактерии, грибы, простейших и многоклеточных паразитов. Антигенные белки, полисахариды, липиды, липопротеины или гликолипиды из патогенов включают в контексте настоящего описания белки, полисахариды, липиды, липопротеины и гликолипиды соответственно из патогенов, ответственных за заболевания, которые могут являться мишенью для вакцинации, включая, например, амебиаз, сибирскую язву, язву Бурули (*Mycobacterium ulcerans*), ассоциированную с калицивирусом диарею, кампилобактериальную диарею, рак шейки матки (папилломатоз человека), ассоциированные с *Chlamydia trachomatis* болезни половой системы, холеру, геморрагическую лихорадку Крым-Конго, лихорадку Денге, дифтерию, геморрагическую лихорадку Эбола, диарею, связанную с энтеропатогенной кишечной палочкой (ЕТЕС), рак желудка (*Helicobacter pylori*), гонорею, болезни, ассоциированные со стафилококком группы А, болезни, ассоциированные со стафилококком группы В, пневмонию и инвазивное заболевание, связанное с *Haemophilus influenzae* В, диарею, связанную с вирусом гепатита А, гепатита В, гепатита С, гепатита Е, генитальные язвы, связанные с вирусом герпеса простого типа 2, ВИЧ/СПИД, болезнь, связанная с нематодами, грипп, японский энцефалит, лихорадку Ласса, лейшманиоз, лептоспироз, рак печени (гепатит В), рак печени (гепатит С), болезнь Лайма, малярию, геморрагическую лихорадку Марбург, корь, эпидемический паротит, назофарингеальный рак (вирус Эпштейна-Барра), менингит, связанный с *Neisseria meningitidis*, пневмонию, связанную с вирусом парагриппа, коклюш, чуму, полиомиелит, бешенство, пневмонию, связанную с респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), лихорадку Рифт-Валли, диарею, связанную с ротавирусом, краснуху, шистосомоз, серьезный ост-

рый респираторный синдром (SARS), шигеллез, оспу, болезни, ассоциированные с *Staphylococcus aureus*, рак желудка (*Helicobacter pylori*), стрептококковую пневмонию и инвазивное заболевание, столбняк, клещевой энцефалит, трахому, туберкулез, туляремию, тифозную лихорадку, болезнь, ассоциированную с вирусом Западного Нила, желтую лихорадку.

Предпочтительно по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп должен презентироваться на клеточной поверхности в контексте ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, и/или в контексте CD1, при этом презентация на клеточной поверхности в контексте ГКГС класса I и/или ГКГС класса II является предпочтительной. Понятие "презентация эпитопа в контексте ГКГС класса I" относится, в частности, к CD8⁺-эпитопу, расположенному в бороздке молекулы ГКГС класса I на поверхности клетки. Понятие "презентация эпитопа в контексте ГКГС класса II" относится, в частности, к CD4⁺-эпитопу, расположенному в бороздке молекулы ГКГС класса II на поверхности клетки. Понятие "презентация эпитопа в контексте CD1" относится, в частности, к липидному эпитопу, расположенному в бороздке молекул кластера дифференцировки 1 на поверхности клетки.

Целесообразно, чтобы комплекс, предлагаемый в изобретении, содержал проникающий в клетку пептид и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп и обеспечивал транспорт и презентацию указанных эпитопов на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток в контексте ГКГС класса I и ГКГС класса II, и поэтому его можно применять для вакцинации и иммунотерапии.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, который представляет собой по меньшей мере один CD4⁺-эпитоп и/или по меньшей мере один CD8⁺-эпитоп.

Понятия "CD4⁺-эпитоп" или "CD4⁺-ограниченный эпитоп" в контексте настоящего описания означают эпитоп, распознаваемый CD4⁺-Т-клеткой, указанный эпитоп, в частности состоит из фрагмента антигена, расположенного в бороздке молекулы ГКГС класса II. Единичный CD4⁺-эпитоп, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно состоит примерно из 12-25 аминокислот. Он может состоять, например, примерно из 8-25 аминокислот или примерно 6-100 аминокислот.

Понятия "CD8⁺-эпитоп" или "CD8⁺-ограниченный эпитоп" в контексте настоящего описания означают эпитоп, распознаваемый CD8⁺-Т-клеткой, указанный эпитоп, в частности, состоит из фрагмента антигена, расположенного в бороздке молекулы ГКГС класса I. Единичный CD8⁺-эпитоп, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно состоит примерно из 8-11 аминокислот. Он может состоять, например, примерно из 8-15 аминокислот или примерно 6-100 аминокислот.

Предпочтительно по меньшей мере один антиген может содержать или по меньшей мере один антигенный эпитоп может состоять из CD4⁺-эпитопа и/или CD8⁺-эпитопа, соответствующего антигенной(ым) детерминанте(ам) ассоциированного с раком/опухолью антигена, специфического для рака/опухоли антигена или антигенного белка из патогена. Более предпочтительно по меньшей мере один антиген может содержать или по меньшей мере один антигенный эпитоп может состоять из CD4⁺-эпитопа и/или CD8⁺-эпитопа, соответствующего антигенной(ым) детерминанте(ам) ассоциированного с раком/опухолью антигена или специфического для рака/опухоли антигена. Наиболее предпочтительно по меньшей мере один антиген может содержать или по меньшей мере один антигенный эпитоп может состоять из CD4⁺-эпитопа и/или CD8⁺-эпитопа, соответствующего антигенной(ым) детерминанте(ам) ассоциированного с опухолью антигена или специфического для опухоли антигена.

Предпочтительно также, чтобы комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержал по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопа, где по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп содержит или состоит из CD4⁺-эпитопа и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп содержит или состоит из CD8⁺-эпитопа. В настоящее время установлено, что Т_H-клетки (CD4⁺) играют основную роль в противоопухолевом иммунном ответе, как в активности ДНК, так и в рекрутменте и поддержании CTL (CD8⁺) в области опухоли. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержащий по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопа, где по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп содержит или состоит из CD4⁺-эпитопа и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп содержит или состоит из CD8⁺-эпитопа, обеспечивает интегрированный иммунный ответ, позволяющий одновременно примировать CTL и Т_H-клетки, и поэтому является предпочтительным для иммунитета против только одного CD8⁺-эпитопа или только одного CD4⁺-эпитопа. Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может предпочтительно содержать Eα-CD4⁺-эпитоп и gp100-CD8⁺-эпитоп.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопа, где по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопа содержат или состоят по меньшей мере из двух, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большего количества CD4⁺-эпитопов и/или по меньшей мере из двух, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большего количества CD8⁺-эпитопов. При этом по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопа предпочтительно представляют собой различные антигены или антигенные эпитопы, более предпочтительно по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопа отличаются друг от друга, но относятся к одному типу опухоли. Полиантигенная вакцина должна (I) предотвращать избыточный рост вариантов без антигена, (II) нацеливаться на различные опухолевые клетки в гетерогенной опухолевой массе и (III) преодолевать

вариабельность опухолей от пациента к пациенту. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, наиболее предпочтительно содержит по меньшей мере четыре антигена или антигенных эпитопа, в частности по меньшей мере два CD8⁺-эпитопа и по меньшей мере два CD4⁺-эпитопа. Указанный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, индуцирует синергетическую функциональную активность полиэпитопных CD8-CTL и CD4-T_H-клеток в отношении опухолевых клеток и усиливает эффективность противоопухолевого иммунитета. T_H-клетки участвуют также в поддержании длительного клеточного иммунитета, который обнаружен после вакцинации. Указанный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, индуцирует поликлональные полиэпитопные иммунные ответы и полифункциональные CD8⁺- и CD4⁺-T-клетки, и поэтому обладает эффективной противоопухолевой активностью.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере два антигена или антигенных эпитопы, более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере три антигена или антигенных эпитопа, еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере четыре антигена или антигенных эпитопа, более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере пять антигенов или антигенных эпитопов и наиболее предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере шесть антигенов или антигенных эпитопов. Антигены или антигенные эпитопы, входящие в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, могут быть одинаковыми или различными, предпочтительно антигены или антигенные эпитопы, входящие в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, отличаются друг от друга. Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один CD4⁺-эпитоп и по меньшей мере один CD8⁺-эпитоп.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит более одного CD4⁺-эпитопа, например два или большее количество CD4⁺-эпитопов из одного и того же антигена или из различных антигенов, и предпочтительно не содержит CD8⁺-эпитоп. Предпочтительно также комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит более одного CD8⁺-эпитопа, например два или большее количество CD8⁺-эпитопов из одного и того же антигена или из различных антигенов, и предпочтительно не содержит CD4⁺-эпитоп. Однако наиболее предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит (I) по меньшей мере один CD4⁺-эпитоп, например два или большее количество CD4⁺-эпитопов из одного и того же антигена или из различных антигенов и (II) по меньшей мере один CD8⁺-эпитоп, например два или большее количество CD8⁺-эпитопов из одного и того же антигена или из различных антигенов.

Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может предпочтительно содержать gp100-CD8⁺-эпитоп, Eα-CD4⁺-эпитоп и дополнительный CD4⁺-эпитоп и дополнительный CD8⁺-эпитоп. Еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид или белок, содержащий gp100-CD8⁺-эпитоп и Eα-CD4⁺-эпитоп. Например, указанный полипептид или белок, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, или вариантов указанной последовательности, указанных выше

ESLKIS QAVHAANA EI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPVRFK F
ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESINF EKLTEWTGS

SEQ ID NO: 14 (MAD5-карго-молекула, содержащая эпитопы OVA-CD4⁺, gp100-CD8⁺, Eα-CD4⁺ и OVA-CD8⁺).

Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать также gp70-CD8⁺-эпитоп и/или gp70-CD4⁺-эпитоп. В частности, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид или белок, содержащий gp70-CD8⁺-эпитоп и/или gp70-CD4⁺-эпитоп. Например, указанный полипептид или белок, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, или вариантов указанной последовательности, указанных выше

VTYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIKDRI

SEQ ID NO: 43 (Mad8-карго-молекула, содержащая эпитопы gp70-CD8⁺ и gp70-CD4⁺).

Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может предпочтительно содержать по меньшей мере один эпитоп сурвивина, такой как CD8⁺-эпитоп сурвивина и/или CD4⁺-эпитоп сурвивина. Более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид или белок, содержащий CD8⁺-эпитоп сурвивина и/или CD4⁺-эпитоп сурвивина. Более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид или белок, содержащий более одного CD8⁺-эпитопа сурвивина и/или более одного CD4⁺-эпитопа сурвивина, например, два различных CD8⁺-эпитопа сурвивина. Например, указанный полипептид или белок, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, или вариантов указанной последовательности, указанных выше

NYRIATFKNWPFLCDCAMEELTVSEFLKLDQR

SEQ ID NO: 44 (Mad 11-карго-молекула, содержащая CD8⁺-эпитоп 1 сурвивина и CD8⁺-эпитоп 2 сурвивина).

Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может предпочтительно содержать эпитоп из неоантигена. Еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид или белок, содержащий эпитоп из неоантигена, такого как неоантиген из опухолевых клеток линии MC-38, идентифицированный Yadav и др. Nature.515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576. Например, указанный полипептид или белок, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, или вариантов указанной последовательности, указанных выше

HLELASMTNMELMSSIV

SEQ ID NO: 42 (Mad9-карго-молекула, содержащая эпитоп из неоантигена, описанного у Yadav и др. Nature, 515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576.

Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может предпочтительно содержать более одного, например два или три эпитопа из неоантигенов. Еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать полипептид или белок, содержащий более одного, например два или три эпитопа из неоантигенов, таких как неоантигены из опухолевых клеток линии MC-38, идентифицированные Yadav и др. Nature.515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576. Например, указанный полипептид или белок, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 63, или вариантов указанной последовательности, указанных выше

LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLELEG

SEQ ID NO: 63 (Mad12-карго-молекула, содержащая эпитоп из неоантигена, описанного у Yadav и др. Nature. 515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576.

Предпочтительно по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой пептид, полипептид или белок. Примеры антигена или антигенного эпитопа пептидной, полипептидной или белковой природы, которые можно применять в изобретении, включают раковые/опухолевые антигены или их антигенные эпитопы, аллергические антигены или их антигенные эпитопы, аутоиммунные аутоантигены или их антигенные эпитопы, антиогены патогенов или их антигенные эпитопы, и антигены или их антигенные эпитопы из вирусов, предпочтительно из таких вирусов, как цитомегаловирус (CMV), ортопоксивирус натуральной оспы, ортопоксивирус белой оспы, парапоксивирус овец, вирус контагиозного моллюска, вирус герпеса простого 1, вирус герпеса простого 2, вирус герпеса В, варицелла-зостер вирус, вирус псевдобешенства, человеческий цитомегаловирус, человеческий вирус герпеса 6, человеческий вирус герпеса 7, вирус Эпштейна-Барра, человеческий вирус герпеса 8, вирус гепатита В, вирус лихорадки Чикунгунья, вирус лихорадки О'Ньонг-Ньонг, рубивирус, вирус гепатита С, GB-вирус С, вирус Западного Нила, вирус Денге, вирус желтой лихорадки, вирус энцефаломиелита овец, вирус энцефалита Сент-Луис, вирус японского энцефалита В, вирус Повассан, FSME-вирус, SARS, SARS-ассоциированный коронавирусы, человеческий коронавирусы 229Е, человеческий коронавирусы Ос43, торовирус, человеческий Т-клеточный лимфотропный вирус типа I, человеческий Т-клеточный лимфотропный вирус типа II, ВИЧ (СПИД), т.е. вирус иммунодефицита человека типа I или вирус иммунодефицита человека типа 2, вирус гриппа, вирус Ласса, вирус лимфоцитарного хориомененгита, вирус Такарибе, вирус Хунин, вирус Мачупо, вирус болезни Борна, вирус Буньямвера, вирус калифорнийского энцефалита, вирус лихорадки Рифт-Валли, вирус флeботомной лихорадки, вирус Тоскана, вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, вирус Хазара, вирус Хасан, вирус Хантаан, вирус Сеул, вирус проспекта Хилл, вирус Пуумала, вирус Добрава-Белград, вирус Тула, вирус Син Номбре, Марбург-вирус озера Виктория, вирус Эбола Заир, вирус Эбола Судан, вирус Эбола Берег Слоновой Кости, вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, вирус парагриппа, малярийный паразит (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*), Марбург-вирус, вирус кори, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцитиальный вирус, человеческий метапневмовирус, индийский вирус везикулярного стоматита, вирус бешенства, вирус Мокола, вирус Дувенхаге, Европейский лисавирус летучих мышей 1+2, Австралийский лисавирус летучих мышей, аденовирус А-Ф, вирус папилломы человека, вирус кондиломы 6, вирус кондиломы 11, вирус полиомы, аденоассоциированный вирус 2, ротавирус, орбивирус, вирус оспы, включая вирус ветряной оспы и т.д., или антигены или антигенные эпитопы из лейшманий, трипаносом, амeб, бактерий и т.д., или можно выбирать из эпитопов или из вариантов указанных выше антигенов или антигенных эпитопов. Предпочтительно эпитопы, а также варианты антигенов, указанных выше, характеризуются гомологией или идентичностью последовательности, составляющей примерно 10%, в частности по меньшей мере 10%, примерно 20%, в частности по меньшей мере 20%, примерно 30%, в частности по меньшей мере 30%, примерно 40%, в частности по меньшей мере 40%, примерно 50%, в частности по меньшей мере 50%, примерно 60%, в частности по меньшей мере 60%, примерно 70%, в частности по меньшей мере 70%, примерно 80%, в частности по меньшей мере 80%, примерно 90%, в част-

ности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98%, с антигенами или последовательностями антигенов, представленными или описанными выше. В этом контексте определения эпитопов и вариантов соответствуют указанным выше.

Примеры антигенов или антигенных эпитопов, относящихся к категории пептида, полипептида или белка, включают комбинацию нескольких эпитопов глиомы, например, описанных у Novellino и др., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(3), 2005, сс. 187-207, Vigneron и др. *Cancer Immun.* 13, 2013, с. 15). Однако индивидуальный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать также только поднабор, т.е. один или несколько из всех указанных эпитопов глиомы. В таком случае предпочтительно различные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат различные поднаборы указанных эпитопов глиомы, так что, например, вакцина, предлагаемая в настоящем изобретении, содержащая различные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, содержит все указанные эпитопы глиомы, но распределенные в различные комплексы.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в изобретении, может содержать также по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, где указанный антиген или антигенный эпитоп представляет собой полисахарид, липид, липопротеин и/или гликолипид, в частности полисахаридный, липидный, липопротеиновый и/или гликолипидный эпитоп, который может, например, представлять собой эпитопы патогена, указанные в настоящем описании.

В частности, комплекс, предлагаемый в изобретении, может содержать по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, где указанный антиген или антигенный эпитоп представляет собой полисахаридный, липидный, липопротеиновый и/или гликолипидный эпитоп, включая антигены или антигенные эпитопы вирусов, бактерий, грибов, простейших и многоклеточных паразитов.

Предпочтительно указанные эпитопы должны презентироваться на клеточной поверхности в контексте ГКГС класса I и/или ГКГС класса II.

Предпочтительно указанные липидные эпитопы должны презентироваться на клеточной поверхности в контексте CD1 (кластер дифференцировки 1).

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, где антиген или антигенный эпитоп представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство или токсин.

Примеры карго-молекул, относящихся к категории низкомолекулярных лекарственных средств или токсинов, которые можно применять согласно изобретению, включают циклоспорин А, паклитаксел, доксорубин, метотрексат, 5-аминолевулиновую кислоту, дифтерийный токсин, сунитиниб и молекулы, сведения о которых обобщены у De wit Amer, *Neuro Oncol.*, 12(3), 2010, сс. 304-316).

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит несколько антигенов или антигенных эпитопов, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее количество антигенов или антигенных эпитопов, более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит (по меньшей мере) два или три антигена или антигенных эпитопов, еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит (по меньшей мере) четыре или пять антигенов или антигенных эпитопов.

Если в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, входит более одного антигена или антигенного эпитопов, то очевидно, что указанный антиген или антигенный эпитоп, в частности, также ковалентно связан в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, например, с другим антигеном или антигенным эпитопом и/или с компонентом а), т.е. проникающим в клетку пептидом, и/или с компонентом в), т.е. пептидным агонистом TLR.

Различные антигены или антигенные эпитопы, входящие в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, могут быть одинаковыми или различными. Предпочтительно различные антигены или антигенные эпитопы, входящие в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, отличаются друг от друга, что приводит к образованию полиантигенного и/или полиэпитопного комплекса.

Кроме того, предпочтительно, чтобы несколько антигенов или антигенных эпитопов, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большее количество антигенов или антигенных эпитопов, располагались последовательно в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении. Это означает, в частности, что все антигены и/или антигенные эпитопы, входящие в комплекс, располагаются в виде участка, который не прерывается ни компонентом а), т.е. проникающим в клетку пептидом, ни компонентом в), т.е. пептидным агонистом TLR. Предпочтительно, компонент а) и компонент в) расположены в комплексе, например, перед или после такого участка, состоящего из всех антигенов и/или антигенных эпитопов. Однако антигены и/или антигенные эпитопы, расположенные таким последовательным образом, могут соединяться друг с другом, например, с помощью спейсера или линкера, описанного ниже, который не является ни компонентом а), т.е. проникающим в клетку пептидом, ни компонентом в), т.е. пептидным агонистом TLR.

Однако в альтернативном варианте различные антигены и/или антигенные эпитопы могут располагаться любым иным образом в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, например, когда компонент а) и/или компонент в) расположены между двумя или большим количеством антигенов и/или

антигенных эпитопов, т.е. один или несколько антигенов и/или антигенных эпитопов расположены между компонентом а) и компонентом в) (или наоборот) и необязательно один или несколько антигенов и/или антигенных эпитопов расположены соответственно на другом конце компонента а) и/или компонента в).

Очевидно, что несколько различных антигенов или антигенных эпитопов, связанных с одним и тем же типом болезни, в частности одним и тем же типом опухоли, целесообразно объединять в одном комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении. Альтернативно этому, несколько различных антигенов или антигенных эпитопов, связанных с одним и тем же типом болезни, в частности одним и тем же типом опухоли, можно подразделять на поднаборы различных антигенов или антигенных эпитопов, в частности поднаборы, дополняющие друг друга в контексте определенного типа болезни, например, опухоли, которые входят в различные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, при этом указанные различные комплексы, содержащие различные поднаборы, целесообразно вводить одновременно, например в виде одной вакцины, индивидууму, который нуждается в этом.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один опухолевый эпитоп, представляющий собой эпитоп антигена, выбранного из группы, состоящей из EpCAM, HER-2/neu, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, сурвивина, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART, IL13R α 2, CMV, EGFRvIII, EphA2, gp100, hTert, TRP-2, YKL-40, бревикана, нейрוליгина 4 и PTPRz1. Более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из EpCAM, HER-2/neu, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, сурвивина, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART, IL13R α 2, CMV, EGFRvIII, EphA2, gp100, hTert, TRP-2, YKL-40, бревикана, нейрוליгина 4 и PTPRz1 или его фрагмента, варианта последовательности опухолевого антигена или варианта последовательности его фрагмента. Предпочтительно также комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один опухолевый эпитоп, который представляет собой эпитоп антигена, выбранного из антигенов глиомы, описанных у Reardon D.A. и др., An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma. Expert Rev Vaccines, 12(6), 2013, сс. 597-615.

В контексте настоящего описания "фрагмент" антигена содержит по меньшей мере 10 последовательно расположенных аминокислот антигена, предпочтительно по меньшей мере 15 последовательно расположенных аминокислот антигена, более предпочтительно по меньшей мере 20 последовательно расположенных аминокислот антигена, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 последовательно расположенных аминокислот антигена и наиболее предпочтительно по меньшей мере 30 последовательно расположенных аминокислот антигена. "Вариант последовательности", указанный выше, означает вариант последовательности, имеющий (аминокислотную) последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична референс-последовательности. "Функциональный" вариант последовательности означает в контексте антигена/фрагмента антигена/эпитопа, что функция эпитопа(ов), например входящего(их) в антиген (фрагмент), не нарушена или утрачена. Однако предпочтительно аминокислотная последовательность эпитопа(ов), например входящего(их) в антиген (фрагмент), указанный в настоящем описании, не изменена в результате мутации и поэтому идентична референс-последовательности эпитопа.

Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы указанных антигенов известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTI-GEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

EpCAM.

EpCam представляет собой гликопротеин, который опосредует клеточную адгезию. Аминокислотная последовательность EpCAM представлена ниже

MAPPQVLAFLGLLAAATATFAAAQEECVCENYKLAVNCVFNNNRQCQCT
 SVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNNDGLYDPCDE
 SGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTTEITCSERVRTYWIIIKHKAREK
 PYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLQNSSQKTQNDVDIAD
 VAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGL
KAGVIAVIVVVVIAVAVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA

[SEQ ID NO: 47].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 47, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов EpCAM. Предпочтительный эпитоп EpCAM, который предпочтительно входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, включает следующий эпитоп (представленная ниже последовательность эпитопа представляет собой фрагмент вышеуказанной последовательности EpCAM, и он подчеркнут в указанной выше последовательности EpCAM; указанная ниже эпитопная последовательность может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

GLKAGVIAV

[SEQ ID NO: 48].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержат аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 48.

HER-2/neu.

Her-2 принадлежит к семейству EGFR (рецептор эпидермального фактора роста). Специалисту в данной области известно много эпитопов HLA-A. Аминокислотная последовательность HER2 представлена ниже

MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHL
 YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQRQVPLQRLRIVR
 GTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQR
 NPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSED
 CQSLTRTVACAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNHSGICE
 LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNL
 QEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFG
 SLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVVFQNL
 QVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTVPW
 DQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFL
 RGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTFCGPEADQCVACA
 NYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC
 PAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRLLQETELVE
 PLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAI
 KVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPLYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCL
 LDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIKGMVSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNH
 VKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTV
 WELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMMVKCWMIDSECRP
 RFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLEDDDDMGDLVDAE
 EYLVPPQGGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPL
 APSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLRYSEDPTVPLPSETDGYVA
 PLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKD
 VFVAFGGAVENPEYLTQGGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTF
 KGTPTAENPEYLGLDVPV

[SEQ ID NO: 70].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 70, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы Her-2 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками, классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1

что приводит к пониженному уровню этих рецепторов на поверхности. Многие его эпитопы известны специалисту в данной области.

КОС1.

КОС1, также известный как мРНК-связывающий белок 3 инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP3), представляет собой мРНК связывающий белок. Однако отсутствуют данные о его экспрессии.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF)/рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR).

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), который первоначально называли фактором сосудистой проницаемости (VPF), представляет собой сигнальный белок, продуцируемый клетками, которые стимулируют васкулогенез и ангиогенез. Он является частью системы, которая восстанавливает поставку кислорода к тканям, когда нарушается циркуляция крови. Обычная функция VEGF состоит в создании новых кровеносных сосудов в процессе эмбрионального развития, новых кровеносных сосудов после повреждения, мышц после физической нагрузки и новых сосудов (колоректальная циркуляция) для обхода заблокированных сосудов. Известно три основных подтипа рецепторов для VEGF (VEGFR), а именно, VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3.

β -субъединица человеческого хорионического гонадотропина (hCG).

Человеческий хорионический гонадотропин (hCG) представляет собой гормон, продуцируемый эмбрионом после имплантации. Некоторые раковые опухоли продуцируют этот гормон; поэтому обнаруженные повышенные уровни у пациента, который не является беременным, могут способствовать диагностике рака. hCG является гетердимером, у которого α -(альфа)-субъединица идентична субъединице лютеинизирующего гормона (LH),

фолликулостимулирующего гормона (FSH), тиреотропного гормона (TSH), а β -(бета)-субъединица является уникальной для hCG. β -субъединица hCG гонадотропина (β -hCG) содержит 145 аминокислот и кодируется шестью высоко гомологичными генами.

Сурвивин.

Сурвивин, который называют также бакуловирусным ингибитором мотива апоптозных повторов 5 или BIRC5, является представителем семейства ингибиторов апоптоза (IAP). Функции белка сурвивина состоят в ингибировании активации каспазы, что приводит к отрицательной регуляции апоптоза или запрограммированной гибели клеток. Аминокислотная последовательность сурвивина представлена ниже

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFELEGACTPERMAEAGFIHCPTENE

PDLAQCFFCFKELEGWEPDDDDPIEENKHKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDR

ERAKNKIAKETNNKKKEFEETAkkVRRAlEQLAAMD

[SEQ ID NO: 52].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 52, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов сурвивина. Предпочтительный эпитоп сурвивина, который предпочтительно входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, включает следующий эпитоп (представленная ниже последовательность эпитопа представляет собой фрагмент вышеуказанной последовательности сурвивина, и он подчеркнут в указанной выше последовательности сурвивина; указанная ниже эпитопная последовательность может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

RISTFKNWPF

[SEQ ID NO: 53].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержат аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 53.

Карциноэмбриональный антиген (CEA).

CEA представляет собой внутриклеточный адгезионный гликопротеин. CEA в норме продуцируется тканью желудочно-кишечной системы в процессе эмбрионального развития, но его производство прекращается перед рождением. Таким образом, CEA, как правило, присутствует лишь в очень невысоких уровнях в крови здоровых взрослых. Аминокислотная последовательность CEA представлена ниже

MESPSAPPHRWCI PWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNV AEGKEV

LLL VHNLPQH LFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIYPNAS

LLIQNIQN DTFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPEL PKPSISSNNSKPVEDKDA

VAFTCEPETQDATYLLWVNNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKC

ETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYS
 WFNNGTFQQTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRRTTVTITVYAEPPKP
 FITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSRLQLSNDNRRLT
 LLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGDDPTISPSYTYRPGVNL
 LSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRT
 TVKTITVSAELPKPSSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPV
 SPRLQLSNGNRRLTLFNVTRNDARA YVCGIQNSVSANRSDPVTLVDVLYGPDTPH
 SPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNGTYA
 CFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVAL

[SEQ ID NO: 54].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 54, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов CEA. Предпочтительные эпитопы CEA, которые предпочтительно входят в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, включает следующие эпитопы (представленные ниже последовательности эпитопов представляют собой фрагмент вышеуказанной последовательности CEA, и они подчеркнуты в указанной выше последовательности CEA; каждая из указанных ниже эпитопных последовательностей может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

YLSGANLNLS

[SEQ ID NO: 55];

SWRINGIPQQ

[SEQ ID NO: 56].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержат аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 55, и/или аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 56.

Рецептор трансформирующего роста фактора $\beta 2$ (TGF β R2) TGF β -рецепторы представляют собой пересекающие клеточную мембрану единственный раз серин/треонинкиназные рецепторы. Они присутствуют в нескольких различных изоформах. TGFPR2 представляет собой трансмембранный белок, который содержит протеинкиназный домен, образует гетеродимерный комплекс с другим рецепторным белком и связывается с TGF- β . Указанный комплекс рецептор/лиганд фосфорилирует белки, которые затем проникают в ядро и регулируют транскрипцию поднабора генов, связанных с клеточной пролиферацией.

P53.

P53 представляет собой белок-супрессор опухоли, который играет роль в предупреждении мутаций генома. P53 обладает несколькими механизмами противоракового действия и играет роль в апоптозе, стабильности генома и ингибировании ангиогенеза. Противораковую функцию p53 осуществляет посредством нескольких механизмов: он активирует белки репарации ДНК, когда ДНК существенно повреждена; он может прекращать рост путем удерживания клеточного цикла в точке регуляции G1/S при распознавании повреждения ДНК; и он может инициировать апоптоз.

Kirsten-подтип Ras (KRas).

ГТФаза KRas, известная как вирусный онкогенный гомолог саркомы крыс V-Ki-ras2 Kirsten и KRAS, выполняет важную функцию в передаче сигналов в здоровой ткани, и мутация гена KRAS является важной стадией в развитии многих типов рака. Подобно другим представителям подсемейства gas белок KRAS представляет собой ГТФазу и является ранним участником многих путей трансдукции сигнала. KRAS, как правило, связан с клеточной мембраной благодаря присутствию изопреновой группы на его С-конце. Аминокислотная последовательность KRas представлена ниже

MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGET
 CLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDINHYREQIKRVK
 DSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQRVEDAFYT
 LVREIRQYRLKKISKEEKTGCVKIKKCPIM

[SEQ ID NO: 57].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 57, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов Kirsten Ras. Предпочтительный эпитоп Kirsten Ras, который предпочтительно входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении,

включает следующий эпитоп (представленная ниже последовательность эпитопа представляет собой фрагмент вышеуказанной последовательности Kirsten Ras, и он подчеркнут в указанной выше последовательности Kirsten Ras; указанная ниже эпитопная последовательность может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

VVVGAGGVG

[SEQ ID NO: 58].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 58.

О-связанная N-ацетилглюкозамин (GlcNac)-трансфераза (OGT) OGT (О-связанная N-ацетилглюкозамин (GlcNac)-трансфераза, О-GlcNac-трансфераза, OGTase, О-связанная N-ацетилглюкозаминилтрансфераза, уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин:полипептид β-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, белок О-связанной β-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы) представляет собой фермент, имеющий систематическое (номенклатурное) название "УДФ-N-ацетил-О-глюкозамин:белок-О-β-N-ацетил-Д-глюкозаминил-трансфераза". OGT катализирует добавление одного N-ацетилглюкозамина в О-гликозидную связь к остаткам серина или треонина внутриклеточных белков. OGT является компонентом хозяйских биологических функций в организме человека. OGT участвует в устойчивости к инсулину в мышечных клетках и адипоцитах путем ингибирования фосфорилирования треонина 308 AKT1, повышает скорость IRS1-фосфорилирования (на серине 307 и серине 632/635), снижает трансдукцию инсулинового сигнала и гликозилирование компонентов пути трансдукции инсулинового сигнала. Кроме того, OGT катализирует внутриклеточное гликозилирование остатков серина и треонина путем добавления N-ацетилглюкозамина. Исследования продемонстрировали, что аллели OGT являются жизненно важными для эмбриогенеза, и OGT необходима для внутриклеточного гликозилирования и жизнеспособности эмбриональных стволовых клеток. OGT катализирует также пост-трансляционную модификацию, которая изменяет факторы транскрипции и РНК-полимеразу II, однако конкретная функция этой модификации в целом неясна.

Каспаза 5 (CASP5).

Каспаза 5 представляет собой фермент, который протеолитически расщепляет другие белки в остатке аспарагиновой кислоты, и принадлежит к семейству цистеиновых протеаз, которые называют каспазами. Она относится к провоспалительным каспазам наряду с каспазой 1, каспазой 4 и мышинной каспазой 4, гомологом каспазы 11, и играет роль в функции иммунной системы.

Колоректальный ассоциированный с опухолью антиген-1 (COA-1).

COA-1 идентифицирован в 2003 г. Maccall с соавторами (Maccall C. и др., Identification of a colorectal tumor-associated antigen (COA-1) recognized by CD4(+) T lymphocytes. Cancer Res, 63(20), 2003, сс. 6735-6743) в качестве белка с высоким уровнем экспрессии в колоректальных клетках и клетках меланомы (данные не представлены). Его мутация может влиять на способность дифференцированно распознавать опухолевые и здоровые клетки.

Ассоциированный с меланомой антиген (MAGE).

Представители семейства генов MAGE (ассоциированный с меланомой антиген) из организма млекопитающих первоначально были описаны как полностью молчащие в тканях здоровых взрослых, за исключением мужских зародышевых клеток, и иногда в плаценте. В противоположность этому указанные гены экспрессируются в различных видах опухолей. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно содержит антиген MAGE-семейства ("MAGE"-антиген) или его эпитоп. Из семейства MAGE предпочтительными являются, в частности, MAGE-A3 и MAGE-D4, и наиболее предпочтительным является MAGE-A3. Нормальная функция MAGE-A3 в здоровых клетках неизвестна. MAGE-A3 представляет собой специфический для опухоли белок, и он идентифицирован на многих опухолях. Аминокислотная последовательность MAGE-A3 представлена ниже

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSTLVEVTL
 GEVPAAESDPQPQSGASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEF
 QAALSRLVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKAFSSSLQ
 LVFGIELMEVDPIGHL YIFATCLGLSYDGLLGDNQIMPKAGLLIIVLAIIPAREGDC
 APEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYE
 FLWGPRALVETSYVKVLHMHMVKISGGPHIS YPPLHEWVLRREGEE

[SEQ ID NO: 59].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 59, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов MAGE-A3. Предпочтительный эпитоп MAGE-A3, который предпочтительно входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении,

включает следующий эпитоп (представленная ниже последовательность эпитопа представляет собой фрагмент вышеуказанной последовательности MAGE-A3, и он подчеркнут в указанной выше последовательности MAGE-A3; указанная ниже эпитопная последовательность может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

KVAELVHFL

[SEQ ID NO: 60].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 60.

Антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками (SART).

Среди семейства SART наиболее предпочтительным является SART-3. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно содержит антиген из SART-семейства (антиген "SART") или его эпитоп; комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, более предпочтительно содержит SART-3 или его эпитоп. Антиген 3 плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками, несет опухолевые эпитопы, обладающие способностью индуцировать HLA-A24-ограниченные и опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты у больных раком пациентов. SART-3, вероятно, участвует в регуляции сплайсинга мРНК.

IL13R α 2.

IL13R α 2 связывается с интерлейкином 13 (IL-13) с очень высокой аффинностью (и может поэтому секвестрировать его), но не обуславливает связывание с IL-4. Он действует в качестве негативного регулятора и IL-13, и IL-4, однако его механизм действия пока не установлен. Аминокислотная последовательность IL13R α 2 представлена ниже

MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLQ
WQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTITTKNLHYKDGFDLNKGIEAKIHT
LLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNWQYLLCSWKP
GIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKADGQNIQCRFPYLEASDYKDFYIC
VNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLPPVYLFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCF
DYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEW
SDKQCWEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTG LLLRKPNTYPKMIPEFFCDT

[SEQ ID NO: 61].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 61, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов IL 13R α 2. Предпочтительный эпитоп IL 13R α 2, который предпочтительно входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, включает следующий эпитоп (представленная ниже последовательность эпитопа представляет собой фрагмент вышеуказанной последовательности IL 13R α 2, и он подчеркнут в указанной выше последовательности IL 13R α 2; указанная ниже эпитопная последовательность может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

LPFGFIL

[SEQ ID NO: 62].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 62.

CMV.

Человеческий цитомегаловирус (CMV), представитель семейства вирусов герпеса, пожизненно сохраняется в организме после, как правило, нераспознанной инфекции. CMV является причиной наиболее часто встречающейся условно-патогенной инфекции ЦНС у некоторых пациентов с ослабленным иммунитетом. После аутопсии нуклеиновую кислоту CMV можно обнаружить в ЦНС более 20% индивидуумов без заболеваний ЦНС, что подтверждает тропизм CMV к клеткам ЦНС и свидетельствует о том, что CMV может пожизненно сохраняться в ЦНС, не оказывая (очевидного) вреда. Однако экспрессия белков и олигонуклеотидов CMV выявлена в большом проценте глиом (Cobbs C.S., Harkins L., Samanta M. и др., Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. Cancer Res. 62, 2002, сс. 3347-3350).

Предпочтительные антигены CMV описаны в WO 2009/155535, например полипептид или его иммуногенный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из капсидных полипептидов, относящихся к покровам полипептидов и оболочечных полипептидов; предпочтительно выбранный из группы, состоящей из уникально длинного фосфопротейна 83 (ppUL83; иначе называемый pp65), гликопротеина UL55 (gpUL55; иначе называемый gB), UL123 немедленно-раннего белка 1 (IE1), UL122 белка IE2, UL11A (иначе называемый mtrll), US28, ppUL32, ppUL65, ppUL80a, ppUL82, ppUL98a, ppUL99, gpUL4 (иначе

называемый gp48), gpUL1 β , gpUL18 (иначе называемый ГКГ), gpUL75 (иначе называемый gH), gpUL100, gpULHO (иначе называемый gM), gpUL115 (иначе называемый gL), pUL46, pUL48, pUL56, pUL86 (иначе называемый MCP), уникально короткого гликопротеина 10 (gpUSIO), gpUSI 1, гликопротеинового комплекса II (gcll), gp65 и gp93. Предпочтительно антиген CMV представляет собой полипептид или его иммуногенный фрагмент, который кодируется геном, соответствующем штамму CMV, зарегистрированному в GENBANK, код доступа BK000394.2 или X1 7403.1. Кроме того, в WO 2009/155535 описаны также предпочтительные эпитопы CMV, такие как пептиды, которые содержат аминокислотные последовательности, описанные у Trivedi и др., Blood, 105, 2005, с. 2793 и в публикации заявки на патент США № 2005/0019344, и другие эпитопы CMV, описанные в WO 2009/155535.

EGFRvIII.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR; ErbB-1; HER1 у людей) является представителем рецептора клеточной поверхности семейства внеклеточных белковых лигандов эпидермального фактора роста (EGF-семейство). EGFRvIII представляет собой мутантную форму EGFR, которая, как известно, играет важную роль в туморогенезе. Так, EGFRvIII представляет собой конститутивно активируемую тирозинкиназу, полученную в результате делеционной мутации в EGFR. Для EGFRvIII характерна выраженная сверхэкспрессия клетками глиобластомы (Saikali S., и др., Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13R α 2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. J Neurooncol., 81(2), 2007, сс. 139-148), которые приобретают повышенную способность к отрицательной регуляции роста, выживаемости, инвазии и рекрутменту новых кровеносных сосудов опухоли.

Специалисту в данной области известно несколько эпитопов EGFRvIII. Предпочтительный эпитоп EGFRvIII, который предпочтительно входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, включает следующий эпитоп (представленная ниже эпитопная последовательность может соответствовать одному эпитопу или нескольким (перекрывающимся) эпитопам)

LEEKKGNYVVTDHC

[SEQ ID NO: 71].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 71.

EphA2.

Эфрины и их рецепторы (эфринные рецепторы, "Eph") принадлежат к подсемейству белков, участвующих в имеющих решающее значение процессах во время эмбрионального развития центральной нервной системы, включая аксональное наведение, клеточную миграцию и ангиогенез. Современные исследования позволили предположить, что Eph/эфрин сверхэкспрессируются клетками глиомы и передача ими сигналов влияет на рост, миграцию и инвазию клеток глиомы (Nakada M., Y. Hayashi и J. Hamada, Role of Eph/ephrin tyrosine kinase in malignant glioma. Neuro Oncol., 13(11), 2011, сс. 1163-1170). Идентифицировано 16 эфриновых рецепторов (Eph). Эфриновые рецепторы подразделяют на две группы на основе сходства последовательностей их внеклеточных доменов, их аффинности связывания с лигандами эфрином-А и эфрином-В. Eph-рецептор А2 (эфринный рецептор типа-А 2) связывается с лигандами в виде эфрина-А.

Аминокислотная последовательность EphA2 представлена ниже

MELQAARACFALLWGICALAAAAAQQGKEVLLDFAAAGGELGWLTHPY

GKGWDLMQNIMNDMPIYMYSVCNVMSGDQDNWLR TNWVYRGEAERIFIELKF

TVRDCNSFPGGASSCKETFNLYYAESDLDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDF
 EARHVKLNVEERSVGPLTRKGFYLAQDIGACVALLSVRVYYKKCEPELLQGLA
 HFPETIAGSDAPSLATVAGTCVDHAVVPPGGEEPMMHCAVDGEWLVPIGQCLC
 QAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASEPCLECEHTLPSPEGATSCECEEGFFRAP
 QDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVYSVTCEQCW
 PESGECGPCEASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVTS
 RSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVSWSIPPPQSRVWKYEVTYRKKGDS
 NSYNVRRTEGFSVTLDDLAPDTTYLVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPESG
 GNLAIVIGGVAVGVVLLVLAGVGGFIHRRRNQRARQSPEDVYFSKSEQLKPLK
 TYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKGMMLTSSGKKE
 VPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMMIITEYM
 ENGALDKFLREKDGESVLQLVGMRLGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILV
 NSNLVCKVSDVGLSRVLEDDPEATYTTSGGKIPRWTAPEAISYRKFTSASDVWS
 FGIWMWEVMTYGERPYWELSNHEVMKAINDFRLPTMDCPSAIYQLMMQCW
 QQERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKTLADFDPRVSIRLPSTSGSEGVPFRVSE
 WLESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTNDDIKRIGVRLPGHQKRIAYSLLG
 LKDQVNTVGIPI

[SEQ ID NO: 72].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 72, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы EphA2 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun.*, 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Gp100.

Гликопротеин 100, gp100 или меланоцитный белок PMEL состоит из 661 аминокислоты и представляет собой трансмембранный гликопротеин типа I, которым обогащены меланосомы, представляющие собой продуцирующие меланин органеллы в меланоцитах. Gp100 участвует в созревании меланосом. Белок gp 100 представляет собой меланомный антиген, т.е. ассоциированный с опухолью антиген. Аминокислотная последовательность gp100 представлена ниже

MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPNRQDWLGVSRLRTRKAWNRQL
 YPEWTEAQRLDWCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSQKVLDPGQ
 VIWVNNTIINGSQVWGGQPVPYQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFYVWVK
 TWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGHTTMEVTYHRRGSRYSVPLAHSSAF
 TITDQVPFVSVSQRLRALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTDW
 FGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTDDGHRPT
 AEAPNTTAGQVPTTEVVGTTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAES
 TGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWV
 ETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRY
 GSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGPKACMEISSPGCQPP
 AQRLCQPVLPSACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQE
 AGLGQVPLIVGILLVMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPLPHSSSHWLRLPRIFC
 SCPIGENSPLLSGQQV

[SEQ ID NO: 73].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит

аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 73, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании. Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы gp100 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками, классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

hTert.

Теломеразная обратная транскриптаза (сокращенно TERT или hTERT у людей) представляет собой каталитическую субъединицу фермента теломеразы, которая вместе с РНК-компонентом теломеразы (TERC) содержит наиболее важную единицу теломеразного комплекса. Теломеразы являются частью отдельной группы РНК-зависимых полимераз. Теломераза удлиняет теломеры в цепях ДНК, что позволяет стареющим клеткам, которые в ином случае становятся постмитотическими и подвергаются апоптозу, превышать предел Хейфлика и становиться потенциально immortalizированными, что часто имеет место в случае раковых клеток. Аминокислотная последовательность hTert представлена ниже

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRAL
 VAQCLVCPWDARPPPAAPSFQRVSCLELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFAL
 LDGARGGPPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARC
 ALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVRE
 AGVPLGLPAPGARRRGGASASRSLPLKRRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTR
 GPSDRGFCVVSAPAEAEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSRPPRPW
 DTPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGRSPWM
 PGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCYPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGV
 CAREKPPQSVAAPPEEEDTPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLW
 GSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAQLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPA
 AEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSSFFYVTETTFQKNRLLFFYRKSVMWKLQ
 SIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPAALLTSRLRFIPKPDGLRPVNM DYVV
 GARTFRREKRAERLTSRVKALFVSNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRARWTFV
 LRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQ
 KAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEAS
 SGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGI
 RRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVPE
 DEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGF
 KAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVL
 QLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQ
 WLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPS
 DFKTILD

[SEQ ID NO: 74].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 74, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании. Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы hTert известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

TRP-2.

Родственный тирозиназе белок 2 (TRP-2, известный также как "L-DOPA-хром-таутомераза") является меланогенным ферментом. TRP-2 регулирует переключение, которое контролирует долю карбоксилированных субъединиц в биополимере меланина. Таким образом, TRP-2 представляет собой мелано-

сомный белок, участвующий в производстве меланина. Для него характерна также сверхэкспрессия в клетках глиобластомы. Аминокислотная последовательность TRP-2 представлена ниже

MSPLWWGFLLSCLGCKILPGAQQFPRVCMTVDSLWNKECCPRLGAESAN
VCGSQQGRGQCTEVRADTRPWSGPYILRNQDDRELWPRKFFHRTCKCTGNFAG
YNCGDCKFGWTGPNKERKKPPVIRQNIHSLSPQEREQFLGALDLAKKRVPDY
VITQHWVGLLPNGTQPQFANCSVYDFVWLHYYSVRDILLGGFFPWLVVY
YRFVIGLRVWQWEVISCKLIKRRATTRQP

[SEQ ID NO: 75].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 75, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании.

Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы TRP-2 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

YKL-40.

YKL-40 (известный также как гликопротеин-39 человеческих хрящей (HC gp-39) и хитиназа-3-подобный белок 1 (CH3L1)) представляет собой секретируемый гликопротеин, и он является представителем 18 семейств гликозилгидролаз. название YKL-40 происходит от трех N-концевых аминокислот, которые присутствуют на секретируемой форме, и его молекулярной массы. YKL-40 секретируется различными типами клеток, включая хондроциты, синовиальные клетки, макрофаги и некоторые типы раковых клеток. Аминокислотная последовательность YKL-40 представлена ниже

MGVKASQTGFVVLVLLQCCSAYKLVCYTWSWSQYREGDGSFCFPDALDRF
LCTHIIYSFANISNDHIDTWEWVDVTLYGMLNLTKNRNPNLKTLLSVGGWNFGS
QRFSKIASNTQSRRTFIKSVPPFLRTHGFDGLDLAWLYPGRDRKQHFTTLIKEMK
AEFIKEAQPGKKQLLSAALSAGKVTIDSSYDIAKISQHLDFISIMTYDFHGAWR
GTTGHHSPLFRGQEDASPRFSNTDYAVGYMLRLGAPASKLVMGIPTFGRSFTL
ASSETGVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAYYEICDFLRGATVHRILGQQVPYATKG
NQWVGYDDQESVSKVQYLKDRQLAGAMVWALDLDLDDFQGSFCGQDLRFPLT
NAIKDALAAT

[SEQ ID NO: 76].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 76, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании. Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы YKL-40 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Бревикан.

Коровий белок бревикан представляет собой белок, который у людей кодируется геном BCAN. Бревикан является представителем семейства белков лектиканов. Бревикан локализован на поверхности нейронов в головном мозге. В меланоцитах экспрессия гена BCAN может регулироваться MITF (связанный с микрофталмией фактор транскрипции). Аминокислотная последовательность бревикана представлена ниже

MAQLFLPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSSEDRAFRVRIAGDAPLQGVLG
 GALTIPCHVHYLRPPPSRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEA
 YRFRVALPAYPASLTDVSLALSELRPNDSGIYRCEVQHGIDSSDAVEVKVKGV
 VFLYREGSARYAFSFGAQEACARIGAHIAATPEQLYAAYLGGYEQCDAGWLS
 QTVRYPIQTPREACYGDMDFGVRNYGVVDPDDLVDVYCYAEDLNGELFLG
 DPPEKLTLEEARAYCQERGAEIATTGQLYAAWDGGLDHCSPGWLADGSVRYPI
 VTPSQRCGGGLPGVKTFLFPNQTGFPNKHSRNFVYCFRDSAQPSAIPASNPAS
 NPASDGLEAIVTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYSIPIMEDGGGGSSTPEDPAE
 APRTLLEFETQSMVPPTGFSEEEGKALEEEEEKYEDEEEKEEEEEEEEEVEDEALWA
 WPSELSSPGPEASLPTEPAAQEESSLQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPPRVH
 GPPTETLPTPRERNLASEPSTLVEAREVGEATGGPELSGVPRGESEETGSSEGAP
 SLLPATRAPEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQPVLPTDSASRGGVAVVPA
 SGDCVSPSPCHNGGTCLEEEEGVRLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQGAC
 YKHFSTRRSWEEAETQCRMYGAHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIE
 GDFLWSDGVPLLYENWNPGQPDSYFLSGENCVVMVWHDQGQWSDVPCNYHL
 SYTCKMGLVSCGPPPELPLAQVFGPRRLRYEVDTVLRYRCREGLAQRNLPLIRC
 QENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKALLIPPSSPMPGP

[SEQ ID NO: 77].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 77, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании. Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы бреви-кана известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun, 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Нейролигин 4.

Нейролигин (NLGN), мембранный белок типа I, представляет собой белок клеточной адгезии на постсинаптической мембране, который обуславливает образование и поддержание синапсов между нейронами. Нейролигины действуют в качестве лигандов для β-нейрексина, которые представляют собой белки клеточной адгезии, локализованные перед синапсами. Нейролигины также влияют на свойство нейронных сетей путем специфических синаптических функций, и они опосредуют передачу сигналов путем рекрутмента и стабилизации ключевых компонентов синапсов. Нейролигины взаимодействуют с другими постсинаптическими белками для локализации рецепторов нейромедиаторов и каналов в постсинаптической плотности. Аминокислотная последовательность нейролигина 4 представлена ниже

MSRPQGLLWLPPLFTPVCVMLNSNVLLWLTALAIKFTLIDSQAQYPVNT
 NYGKIRGLRTPLPNEILGPVEQYLVGPYASPTGERRFQPPEPPSSWTGIRNTTQF
 AAVCPQHLDERSLLHDMLPIWFTANLDTLMTYVQDQNECLYLNIVPTEDDI
 HDQNSKKPVMVYIHGGSYMEGTGNMIDGSILASYGNVIVITINYRLGILGFLSTG
 DQAAKGNYGLLDQIQALRWIEENVGAFGGDPKRVTFGSGAGASCVSLLTLSHY
 SEGLFQKAIQSGTALSSWAVNYQPAKYTRILADKVGCMMLDTTDMVECLRNK
 NYKELIQQTITPATYHIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGEFLNYDIMLGVNQGEG

LKFVDGIVDNEDGVTPNDFDFSVSNFVDNLYGYPEGKDTLRETIKFMYPDWAD
 KENPETRRKTLVALFTDHQWVAPAVATADLHAQYGSPTYFYAFYHHCQSEMK
 PSWADSAHGDEVVYVFGIPMIGPTELFSCNFVSKNDVMSLAVVMTYWTNFAKTG
 DPNQPVQDTKFIHTKPNRFEEVAWSKYNPKDQLYLHIGLKPRVRDHYRATKV
 AFWLELVPHLHNLNEIFQYVSTTTKVPDPMTSFPYGTTRRSPAKIWPTTKRPAIT
 PANNPKHSKDPHKTGPEDTTVLIETKRDYSTEIVTIAVGASLLFLNILAFAALY
 YKKDKRRHETHRRPSPQRNTTNDIAHIQNEEIMSLQMKQLEHDHECESLQAHDT
 LRLTCPPDYTLTLRRSPDDIPLMTPNTITMIPNTLTGMQPLHTFNTFSGGQNSTNL
 PHGHSTTRV

[SEQ ID NO: 78].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 78, или ее фрагмент или вариант, указанный в настоящем описании. Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы нейрוליрина 4 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun, 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺- или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

PTPRz1.

Тирозинпротеинфосфатаза зета рецепторного типа, известная также как фосфакан, представляет собой пересекающий клеточную мембрану единственный раз мембранный белок типа I с двумя цитоплазматическими тирозинпротеинфосфатазными доменами, доменом α -карбоангидразы и доменом фибронектина типа III, и принадлежит к семейству рецепторных тирозинфосфатаз. Как для белка, так и для транскрипта характерна сверхэкспрессия в клетках глиобластомы, усиливающая их гаптотактическую миграцию. Аминокислотная последовательность PTPRz1 представлена ниже

MRILKRFLACIQLLCVCRLDWANGYYRQQRKLVVEEIGWSYTGALNQKNW
 GKKYPTCNSPKQSPINIDEDLTQVNVNLKCLKFQGWDKTSLENTFIHNTGKTVEI
 NLTNDYRVSSGGVSEMVFKASKITFWGKCNMSSDGEHSLEGQKFPLEMQIYC
 FADRFSSEFEAVKGGKGLRALSILFEVGTENLDFKAIIDGVESVSRFGKQAAL
 DPFILLNLLPNSTDKYIYNGSLTSPCTDTVDWIVFKDTSISESQLAVFCEVLT
 MQQSGYVMLMDYLQNNFREQQYKFSRQVFSSYTGKEEIHAEVCSSEPENVQAD
 PENYTSLLVTWERPRVVYDTMIEKFAVLYQQLDGEDQTKHEFLTDGYQDLGAI
 LNNLLPNMSYVLQIVAICTNGLYGKYSDDLIVDMPTDNPELDFPELIGTEEIIKE
 EEEGKDIEEGAIVNPGRDSATNQIRKKEPQISTTTHYNRIGTKYNEAKTNRSPTR
 GSEFSGKGDVPNTSLNSTSQPVTKLATEKDISLTSQTVTELPHTVEGTSASLND
 GSKTVLRSPhMNLSGTAESLNTVSITEYEEESLLTSFKLDTGAEDSSGSSPATSAI
 PFISENISQGYIFSENPEITITYDVLIPESARNASEDSTSSGSEESLKDPSMEGNVW
 FPSSTDITAQPDVGSGRESFLQTNYTEIRVDESEKTKSFSAGPVMSQGPSVTDLE
 MPHYSTFAFYFTEVTPHAFTPSSRQQLVSTVNVVYSQTTQPVYNGETPLQPSY
 SSEVFPLVTPLLLQILNTPAASSSDSALHATPVFPSVDVSFESILSSYDGPALL
 PFSSASFSELFRHLHTVSQILPQVTSATESDKVPLHASLPVAGGDLLEPSLAQY
 SDVLSTTHAASETLEFGSESGVLYKTLMFSSQVEPPSSDAMMHARSSGPEPSYAL
 SDNEGSQHIFTVSYSSAIPVHDSVGVTYQGSLSFGPSHIPKSSLITPTASLLQPTH
 ALSGDGEWSGASSDSEFLPDTDGLTALNISSPVSAEFTYTTSVFGDDNKALSK
 SEIYGNETELQIPSFNEMVYPSESTVMPNMYDENVNKLNASLQETSVSISSTKGM
 FPGSLAHTTKVFDHEISQVPENNFVQPTHVTSQASGDTSLKPVLSANSEPASS
 DPASSEMLSPSTQLLFYETSASFSTEVLLQPSFQASDVTLLKTVLPAVPSDPILV
 ETPKVDKISSTMLHLIVSNSASSENMLHSTSVPVFVDSPTSHMHSASLQGLTISY
 ASEKYEPVLLKSESSHQVVPVSLYSNDELQFQANLEINQAHPKGRHVFAATPVLISI
 DEPLNLINKLIHSDEILTSTKSSVTGKVFAGIPTVASDTFVSTDHSPVINGHVAI
 TAVSPHRDGSVTSTKLLFPSKATSELSHSAKSDAGLVGGGEDGDTDDDDGDDDD
 DDRGSDGLSIHKCMSCSSYRESQEKVMNDSSTHENSMDQNNPISYSLSENSEE
 DNRVTSVSSDSQTGMDRSPGKSPSANGLSQKHNDGKEENDIQTGSALLPLSPES
 KAWAVLTSDEESGSGQGTSDSLNENETSTDFSFADTNEKDADGILAAAGDSEITP
 GFPQSPTSSVTSSENSEVFHVSEAEASNSSHESRIGLAEGLESEKKAVIPLVIVSALT
 FICLVVLVGLIYWRKCFQTAHFYLEDSTSPRVISTPPTPIFPISSDDVGAIPKHFPK
 HVADLHASSGFTEEFETLKEFYQEVQSCVTLGITADSSNHPDNKHKNRINIVA
 YDHSRVKLAQLAEKDGKLTDYINANYVDGYNRPKAYIAAQGPLKSTAEDFWR
 MIWEHNVEVIVMITNLVEKGRRKCDQYWPADGSEEYGNFLVTQKSVQVLAYY
 TVRNFTLRNTKIKKGSQKGRPSGRVVTQYHYTQWPDGMGVPEYSLPVLTFVRKA
 AYAKRHA VGPVVVHCSAGVGRGTGYIVLDSMLQQIQHEGTVNIFGLKHRSQR
 NYLVQTEEQYVFIHDTLVEAILSKETEVLDSHIHAYVNALLIPGPAGKTKLEKQF
 QLLSQSNIQQSDYSAALKQCNREKNRTSSIIIPVERSRVGISSLSGEGTDYINASYM
 GYYQSNEFIITQHPLLHTIKDFWRMIWDHNAQLVVMIPDGQNAEDEFVYWPN
 KDEPINCESFKVTLMAEEHKCLSNEEKLIQDFILEATQDDYVLEVRHFQCPKW
 NPDSPISKTFELISVIKEEAANRDGPMIVHDEHGGVTAGTFCALTTLMHQLEKEN
 SVDVYQVAKMINLMRPGVFADIEQYQFLYK VILSLVSTRQEENPSTSLDSNGAA
 LPDGNIAESLES LV

[SEQ ID NO: 79].

Таким образом, предпочтительный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 79, или ее фрагмент или вариант,

указанный в настоящем описании. Как описано выше, приемлемые раковые/опухолевые эпитопы РТРz1 известны из литературы или их можно идентифицировать с использованием баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, в которых человеческие опухолевые антигены, распознаваемые CD4⁺-или CD8⁺-Т-клетками классифицированы на 4 основные группы на основе схемы их экспрессии, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один опухолевый эпитоп, который представляет собой эпитоп антигена, выбранного из группы, состоящей из EpCAM, MUC-1, сурвивина, CEA, KRas, MAGE-A3, IL13R α 2, EGFRvIII, EphA2, Her2/neu, TRP-2, бревикана, нейролигина 4 и РТРz1, такой как эпитоп, имеющий любую из SEQ ID NO: 48, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 60, 62 и 71; более предпочтительно по меньшей мере один опухолевый эпитоп представляет собой эпитоп антигена, выбранного из группы, состоящей из EpCAM, MUC-1, сурвивина, CEA, KRas, MAGE-A3, EGFRvIII, EphA2, IL-13R α 2, TRP-2 и бревикана, такой как эпитоп, имеющий любую из SEQ ID NO: 48, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 60, 62 и 71; и еще более предпочтительно по меньшей мере один опухолевый эпитоп представляет собой эпитоп антигена, выбранного из группы, состоящей из EpCAM, MUC-1, сурвивина, CEA, EGFRvIII, EphA2 и бревикана, такой как эпитоп, имеющий любую из SEQ ID NO: 48, 50, 51, 53, 55, 56 и 71.

Предпочтительным является также комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который содержит

один или несколько эпитопов EpCAM (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 48) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов MUC-1 (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 50, и/или эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 51) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов сурвивина (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 53) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов CEA (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 55, и/или эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 56) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов KRas (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 58) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов MAGE-A3 (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 60) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов EGFRvIII (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 71) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов EphA2 или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов Her2/neu или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов IL-13R α 2 (например, эпитоп, имеющий SEQ ID NO: 62) или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов TRP-2 или функциональные варианты их последовательностей;

один или несколько эпитопов бревикана или его функциональные варианты последовательности;

один или несколько эпитопов нейролигина 4 или функциональные варианты их последовательностей; и/или

один или несколько эпитопов РТРz1 или функциональные варианты их последовательностей.

Как описано выше, дополнительные эпитопы этих антигенов (в дополнение к приведенным в качестве примера эпитопам) легко можно получить из баз данных раковых/опухолевых эпитопов, например, описанных у van der Bruggen P., Stroobant V., Vigneron N., Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun., 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, или из базы данных "Tantigen" (TANTIGEN, версия 1.0, 1 декабря 2009 г., созданной Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

"Вариант последовательности" представляет собой описанный выше вариант, а именно, вариант последовательности имеет (аминокислотную) последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична референс-последовательности. "Функциональный" вариант последовательности означает в контексте эпитопа, что функция в качестве эпитопа не нарушается или элиминируется. Однако предпочтительно аминокислотная последовательность эпитопа ракового/опухолевого антигена, указанного в настоящем описании, не изменена в результате мутации, и, следовательно, идентична референс-последовательности эпитопа.

Предпочтительным является также комплекс, предлагаемый в изобретении, который содержит фрагмент EpCAM, содержащий один или несколько эпитопов или функциональный вариант его по-

Также более предпочтительный указанный комплекс содержит один или несколько эпитопов TRP-2 или функциональные варианты их последовательностей.

Указанный комплекс предпочтительно не содержит эпитоп EGFRvIII, EphA2, IL-13R α 2, бревикана, CMV, gp100, Her2/neu, сурвивина, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, нейролигина 4 или PTPRz1.

Также более предпочтительный указанный комплекс содержит один или несколько эпитопов бревикана или функциональные варианты их последовательностей.

Указанный комплекс предпочтительно не содержит эпитоп EGFRvIII, EphA2, IL-13R α 2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, сурвивина, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, нейролигина 4 или PTPRz1.

Компонент в) - пептидный агонист TLR.

В комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, пептидный агонист TLR обеспечивает повышенный таргетинг вакцины к дендритным клеткам наряду с аутоиммуногенностью. Физическая связь пептидного агониста TLR с CPP и по меньшей мере одним антигеном или антигенным эпитопом, предлагаемым в настоящем изобретении, в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, обеспечивает повышенный иммунный ответ путем одновременной стимуляции антигенпрезентирующих клеток, в частности дендритных клеток, которые интернализируют, метаболизируют и экспонируют антиген(ы).

В контексте настоящего изобретения "пептидный агонист TLR" представляет собой агонист Толл-подобного рецептора (TLR), т.е. он связывается с TLR и активирует TLR, в частности, приводя к биологическому ответу. Кроме того, пептидный агонист TLR представляет собой пептид, полипептид или белок, описанный выше. Предпочтительно пептидный агонист TLR содержит от 10 до 150 аминокислот, более предпочтительно от 15 до 130 аминокислот, еще более предпочтительно от 20 до 120 аминокислот, еще более предпочтительно от 25 до 110 аминокислот и наиболее предпочтительно от 30 до 100 аминокислот.

Толл-подобные рецепторы (TLR) представляют собой трансмембранные белки, характеризующиеся внеклеточным, трансмембранным и цитозольным доменами. Внеклеточные домены, содержащие богатые лейцином повторы (LRR) подковообразной формы, участвуют в распознавании стандартных молекулярных структур (паттернов) из разнообразных микробов. Толл-подобные рецепторы включают TLR 1-10. Соединения, обладающие способностью активировать TLR-рецепторы, и их модификации и производные, хорошо известны в данной области. TLR1 может активироваться бактериальными липопротеинами и их ацетилированными формами, TLR2 может в дополнение к указанному активироваться гликолипидами грамположительных бактерий, LPS, LPA, LTA, фимбриями, белками наружной мембраны, белками теплового шока из бактерий или из хозяина и липоарабиноманнанами микобактерий. TLR3 может активироваться dsPНК, в частности вирусного происхождения, или химическим соединением поли(LC). TLR4 может активироваться LPS, LTA грамотрицательных бактерий, белками теплового шока из хозяина или бактериального происхождения, белками покрытия или оболочки вирусов, таксолом или его производными, содержащими гиалурон олигосахаридами и фибронектинами. TLR5 может активироваться бактериальными флагеллами или флагеллином. TLR6 может активироваться липопротеинами микобактерий и чувствительным к тепловой обработке растворимым фактором стрептококков группы В (GBS-F) или модулинами стафилококков. TLR7 может активироваться имидазохинолинами. TLR9 может активироваться комплексами метилированного CpG-ДНК или хроматин-IgG.

Предпочтительно пептидный агонист TLR, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, является агонистом TLR1, 2, 4, 5, 6 и/или 10. TLR экспрессируются либо на клеточной поверхности (TLR1, 2, 4, 5, 6 и 10), либо на мембранах внутриклеточных органелл, таких как эндосомы (TLR3, 4, 7, 8 и 9). Известные встречающиеся в естественных условиях лиганды для эндосомальных рецепторов представляют собой молекулы на основе нуклеиновых кислот (за исключением TLR4). Экспрессируемые на клеточной поверхности TLR1, 2, 4, 5, 6 и 10 распознают молекулярные паттерны внеклеточных микробов (Monie T.P., Bryant C.E. и др. *Activating immunity: Lessons from the TLRs and NLRs. Trends Biochem. Sci.* 34(11), 2009, сс. 553-561). TLR экспрессируются на нескольких клеточных типах, но фактически все TLR экспрессируются на DC, обеспечивая этим специализированным клеткам чувствительность ко всем возможным патогенам и сигналам опасности.

При этом TLR2, 4 и 5 конститутивно экспрессируются на поверхности DC. Таким образом, пептидный агонист TLR, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, более предпочтительно представляет собой пептидный агонист TLR2, TLR4 и/или TLR5. Еще более предпочтительно пептидный агонист TLR представляет собой пептидный агонист TLR2 и/или пептидный агонист TLR4. Наиболее предпочтительно пептидный агонист TLR представляет собой пептидный агонист TLR4. Наиболее предпочтительно пептидный агонист TLR представляет собой пептидный агонист TLR, который является агонистом и TLR2, и TLR4. TLR2 может обнаруживать широкое разнообразие лигандов, полученных из бактерий, вирусов, паразитов и грибов. Специфичность лиганда часто определяют по взаимодействию TLR2 с другими TLR, такими как TLR1, 6 или 10, или не относящимися к TLR молекулами, такими как дектин-1, CD 14 или CD36. Образование гетеродимера с TLR1 позволяет TLR2 идентифицировать триацильные липопротеины или липопептиды (мико)бактериального происхождения, такие как Pam3CSK4 и пептидогликан (PGA; Gay N.J. и Gangloff M., *Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu.*

Rev. Biochem. 76, 2007, сс. 141-165; Spohn R., Buwitt-Beckmann U. и др., Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2-Structure-activity relationships. Vaccine 22(19), 2004, сс. 2494-2499). Гетеродимеризация TLR2 и 6 позволяет обнаруживать диацильные липопептиды и зимозан. Липополисахарид (LPS) и его производные являются лигандами для TLR4, а флагеллин для TLR5 (Bryant C. E., Spring D.R. и др., The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. Nat. Rev. Microbiol. 8(1), 2010, сс. 8-14).

TLR2 взаимодействует с широким спектром обладающих структурным разнообразием лигандов, включая молекулы, экспрессируемые микробами и грибами. Идентифицировано множество агонистов TLR2, включая встречающиеся в естественных условиях и синтетические липопептиды (например, активный макрофаги липопептид *Mycoplasma fermentas* (MALP-2)), пептидогликаны (PG, например, из *S.aureus*), липополисахариды (LPS) из различных штаммов бактерий, полисахариды (например, зимозан), заякоренные гликозидфосфатидилинозитолом структуры из грамположительных бактерий (например, липотейхоевая кислота (LTA) и липоарабиноманнан из микобактерий и липоманнаны из *M.tuberculosis*). Некоторые вирусные детерминанты могут также "запускаться" через TLR2 (Barbalat R., Lau L., Locksley R.M., Barton G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. Nat. Immunol. 10(11), 2009, сс. 1200-1207). Бактериальные липопептиды являются структурными компонентами клеточных оболочек. Они состоят из ацилированного α -глицерилцистеинового остатка, с которым пептид может быть конъюгирован через цистеиновый остаток. Примеры агонистов TLR2, представляющих собой бактериальные липопептиды, включают MALP-2 и его синтетический аналог дипальмитоил-S-глицерилцистеин (Pam_2Cys) или трипальмитоил-S-глицерилцистеин (Pam_3Cys).

Множество лигандов взаимодействует с TLR4, включая монофосфорил-липид А из *Salmonella minnesota* R595 (MPLA), липополисахариды (LPS), маннаны (*Candida albicans*), гликоинозитолфосфолипиды (*Tyranosoma*), вирусные оболочечные белки (RSV и MMTV) и эндогенные антигены, включая фибриноген и белки теплового шока. Указанные агонисты TLR4 описаны, например, у Akira S., Uematsu S., Takeuchi O., Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 124(4), 24 февраля 2006 г., сс. 783-801 или у Kumar H., Kawai T., Akira S., Toll-like receptors and innate immunity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 388(4), 30 октября 2009 г., сс. 621-625. LPS, который обнаружен в наружных мембранах грамотрицательных бактерий, является наиболее широко изученным из лигандов TLR4. Приемлемые полученные из LPS пептидные агонисты TLR4 описаны, например, в WO 2013/120073 (A1).

TLR5 "запускается" областью молекулы флагеллина, экспрессируемой практически всеми подвижными бактериями. Так, флагеллин или пептиды или белки, полученные из флагеллина и/или вариантов или фрагментов флагеллина, также пригодны в качестве пептидных агонистов TLR, входящих в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении.

Таким образом, примеры пептидных агонистов TLR включают липопептидные агонисты TLR2 MALP-2, Pam_2Cys и Pam_3Cys или их модификации, различные формы LPS-агонистов TLR4, например, L3-LPS *N.meningitidis* дикого типа и мутантный пентаацилированный LpxL1-LPS, и агонист TLR5 флагеллин.

Однако предпочтительно, чтобы пептидный агонист TLR, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, не представлял собой ни липопептид, ни липопротеин, ни гликопептид, ни гликопротеин, более предпочтительно, пептидный агонист TLR, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой классический пептид, полипептид или белок, указанный в настоящем описании.

Предпочтительным агонистом TLR2 является аннексии II или его иммуномодуляторный фрагмент, который подробно описан в WO 2012/048190 A1 и заявке на патент США 13/0331546, в частности, предпочтительными являются пептидный агонист TLR2, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 7, описанную в WO 2012/048190 A1, или его фрагменты или варианты.

Таким образом, пептидный агонист TLR2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или варианта этой последовательности, описанного выше, является наиболее предпочтительным в качестве компонента в), т.е. в качестве по меньшей мере одного пептидного агониста TLR, входящего в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении.

STVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 15 (пептидный агонист TLR2 Апаха).

Касательно TLR4, то наиболее предпочтительными пептидными агонистами TLR являются агонисты, которые соответствуют мотивам, которые связываются с TLR4, в частности (I) пептиды, имитирующие встречающийся в естественных условиях лиганд LPS (RS01: Gln-Glu-Ile-Asn-Ser-Ser-Туг и RS09: Ala-Pro-Pro-His-Ala-Leu-Ser) и (II) полученные из фибронектина пептиды. Клеточный гликопротеин фибронектин (FN) имеет множество изоформ, созданных из одного гена в результате альтернативного сплайсинга трех экзонов. Одна из этих изоформ представляет собой экстра-домен А (EDA), который взаимодействует с TLR4.

Другие приемлемые пептидные агонисты TLR содержат EDA-домен фибронектина или его фраг-

мент или вариант. Указанные приемлемые EDA-домены фибронектина или их фрагменты или варианты описаны в EP 1913954B1, EP 2476440 A1, US 2009/0220532 A1 и WO 2011/101332 A1. Таким образом, пептидный агонист TLR4, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45 или варианта этой последовательности, описанного выше, является наиболее предпочтительным в качестве компонента в), т.е. в качестве по меньшей мере одного пептидного агониста TLR, входящего в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении

NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQQQVSRVRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDG

EDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQT

SEQ ID NO: 45 (пептидный агонист TLR4 EDA).

Кроме того, белок 1 высокомолекулярной группы (белок из группы ядерных негистоновых белков HMGB) (HMGB1) и его пептидные фрагменты, как предполагается, могут являться агонистами для TLR4. Указанные полученные из HMGB1 пептиды описаны, например, в US 2011/0236406 A1.

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один пептидный агонист TLR, предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит более одного пептидного агониста TLR, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более пептидных агонистов TLR, более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит (по меньшей мере) два или три пептидных агониста TLR, еще более предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит (по меньшей мере) четыре или пять пептидных агонистов TLR. Если более одного пептидного агониста TLR содержится в комплексе, предлагаемом с настоящим изобретением, то, как должно быть очевидно, указанный пептидный агонист TLR также, в частности, ковалентно связан в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, например, с другим пептидным агонистом TLR и/или с компонентом а), т.е. проникающим в клетку пептидом, и/или с компонентом б), т.е. антигеном или антигенным эпитопом.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит один единственный пептидный агонист TLR. В частности, в указанном наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит один единственный пептидный агонист TLR и в нем не присутствует никакой дополнительный компонент, обладающий свойствами антагониста TLR, за исключением одного единственного указанного пептидного агониста TLR.

Если несколько пептидных агонистов TLR входят в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, то они могут быть одинаковыми или различными. Предпочтительно, если несколько пептидных агонистов TLR входят в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, то они отличаются друг от друга.

Кроме того, предпочтительно, чтобы более одного антигена или антигенного эпитопа, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 антигенов или антигенных эпитопов, или более одного пептидного агониста TLR, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 агонистов TLR, располагались последовательно в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении. Это означает, в частности, что все пептидные агонисты TLR, входящие в комплекс, располагаются в виде участка, который не прерывается ни компонентом а), т.е. проникающим в клетку пептидом, ни компонентом б), т.е. по меньшей мере одним антигеном или антигенным эпитопом. Предпочтительно компонент а) и компонент б) располагаются в комплексе, например, до или после указанного участка из всех пептидных агонистов TLR. Однако пептидные агонисты TLR, расположенные таким последовательным образом, могут соединяться друг с другом, например, с помощью спейсера или линкера, описанного ниже, который не является ни компонентом а), т.е. проникающим в клетку пептидом, ни компонентом б), т.е. по меньшей мере одним антигеном или антигенным эпитопом.

Однако альтернативно этому, различные пептидные агонисты TLR можно располагать также любым другим образом в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, например с компонентом а) и/или компонентом б), расположенным между двумя или большим количеством пептидных агонистов TLR, т.е. с одним или большим количеством пептидных агонистов TLR, расположенных между компонентом а) и компонентом б) (или наоборот) и необязательно с одним или несколькими пептидными агонистами TLR, расположенными на соответствующем другом конце компонента а) и/или компонента б).

Должно быть очевидно, что может оказаться целесообразным, чтобы несколько различных пептидных агонистов TLR, активирующих одинаковые или различные TLR-рецепторы, входили в один комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении. Альтернативно этому, несколько различных пептидных агонистов TLR, активирующих одинаковые или различные TLR-рецепторы, можно подразделять на поднаборы различных пептидных агонистов TLR, активирующих одинаковые или различные TLR-рецепторы, которые входят в различные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, при этом указанные различные комплексы, содержащие различные поднаборы, целесообразно вводить одновременно, например, в виде одной вакцины, индивидууму, который нуждается в этом.

Соединение компонентов а), б) и в) в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

В комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, компоненты а), б) и в) ковалентно связаны, т.е. связь между двумя из трех компонентов а), б) и в) в комплексе, предлагаемом в настоящем изобрете-

нии, представляет собой ковалентную связь. Предпочтительно два из трех компонентов а), б) и в) комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении (т.е. "первый" и "второй" компонент), ковалентно связаны друг с другом, а третий компонент из трех компонентов а), б) и в) ковалентно связан либо с первым компонентом из трех компонентов а), б) и в), либо со вторым компонентом из трех компонентов а), б) и в). Тем самым предпочтительно образуется линейная молекула. Однако также возможно, чтобы каждый из трех компонентов а), б) и в) был ковалентно связан с обоими другими компонентами из трех компонентов а), б) и в).

Понятие "ковалентное соединение" (также ковалентная связь) в контексте настоящего изобретения относится к химической связи, которая включает перекрытие ("обобществление") электронных пар между атомами. "Ковалентное соединение" (также ковалентная связь) включает, в частности, стабильный баланс сил притяжения и отталкивания между атомами, когда они имеют общие электроны. Для многих молекул обобществление электронов позволяет каждому атому достигать состояния полной внешней оболочки, соответствующего стабильной электронной конфигурации. Ковалентное связывание включает много типов взаимодействий, включая, например, σ -связывание, π -связывание, связывание по типу металл-с-металлом, агонистические взаимодействия и трехцентровые связи двумя электронами. Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно обозначать также как "соединение", в частности, его можно обозначать как "молекула".

Предпочтительно в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, компоненты а), б) и в) ковалентно связаны путем химического сочетания любым приемлемым путем, известным в данной области, например, методами перекрестного сшивания. Однако следует учитывать тот факт, что многие известные методы химического перекрестного сшивания являются неспецифическими, т.е. они не направляют точку сочетания к какому-либо конкретному положению на компонентах а), б) и в). Таким образом, применяемые неспецифические перекрестносшивающие агенты могут атаковать функциональные сайты или стерически блокировать активные сайты, делая слитые компоненты комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, биологически неактивными. Специалисту в данной области известно, как блокировать потенциально реактивные группы путем применения соответствующих защитных групп. Альтернативно этому, можно применять методики на основе сильного и универсального лигирования оксима и гидразона, которые представляют собой хемоселективные субстанции, пригодные для перекрестного сшивания компонентов а), б) и в). Указанная технология связывания описана, например, у Rose и др., JACS 116, 1994, с.30.

Специфичность сочетания можно повышать путем прямого химического связывания с функциональной группой, которая встречается только один раз или несколько раз в компонентах а), б) и/или в), при этом функциональную группу можно перекрестно связывать с другой, присутствующей в компонентах а), б) или в). Так, например, можно применять тиольную группу цистеина, если только один остаток цистеина присутствует в конкретном компоненте а), б) или в) комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении. Так, например, если конкретный компонент а), б) или в) не содержит остатки лизина, то перекрестносшивающий реагент, специфический для первичных аминов, может быть селективным для аминоконца соответствующего компонента. Альтернативно этому, перекрестное сшивание можно осуществлять также через боковую цепь остатка глутаминовой кислоты, расположенного на N-конце пептида, в результате чего можно создавать амидную связь через ее боковую цепь. Таким образом, может оказаться целесообразным связывать остаток глутаминовой кислоты с N-концом конкретного компонента а), б) или в). Однако, если цистеиновый остаток подлежит интродукции в конкретный компонент а), б) или в), то предпочтительной является интродукция на N- или C-конец или вблизи него. Известны общепринятые методы для таких изменений аминокислотных последовательностей, основанных на модификациях конкретного компонента а), б) или в), либо путем добавления одной или нескольких аминокислот, например, среди прочего, остатка цистеина, для транслоцирования последовательности, либо путем замены по меньшей мере одного остатка транслоцированной(ых) последовательности(ей), входящей(их) в соответствующий компонент. В случае, когда боковую цепь цистеина используют для целей сочетания, то конкретный компонент а), б) или в) предпочтительно имеет один остаток цистеина. Любой второй остаток цистеина предпочтительно не требуется и его можно необязательно заменять, когда он присутствует в соответствующем компоненте, который входит в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении. Когда остаток цистеина заменяют в исходной последовательности конкретного компонента а), б) или в), то, как правило, требуется минимизировать образовавшиеся изменения в укладке пептида соответствующего компонента. Изменения в укладке минимизируют, когда замена представляет собой химическую замену и стерически сходную с цистеином. Так, серин является предпочтительной заменой для цистеина.

Сочетание двух из трех компонентов а), б) и в) можно осуществлять с помощью связывающего или конъюгирующего агента, используя стандартные связывающие реагенты для синтеза пептидов, такие как NOBt, NBTU, DICl, TBTU. Известно несколько агентов, осуществляющих межмолекулярное перекрестное сшивание, которые можно использовать, см., например, Means и Feeney, Chemical Modification of Proteins, изд-во Holden-Day, 1974, сс 39-43. Среди этих реагентов следует отметить, например, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) или N,N-(1,3-фенилен)бисмалеимид; N,N'-этилен-

бис(йодацетамид) или другой такой реагент, имеющий метиленовые мостики, содержащие 6-11 атомов углерода; и 1,5-дифтор-2,4-динитробензол. Другие перекрестносшивающие агенты, которые можно применять для этой цели, включают: п,п'-дифтор-м,м'-динитродифенилсульфон; диметиладипимидат; фенол-1,4-дисульфонила хлорид; гексаметилендиизоцианат или диизотиоцианат или азобенил-п-диизоцианат; глутаровый альдегид и дисдiazобензидин. Перекрестносшивающие агенты могут быть гомобифункциональными, т.е. иметь две функциональные группы, которые подвергаются одинаковой реакции. Предпочтительным гомобифункциональным перекрестносшивающим агентом является бисмалеимидогексан (ВМН). ВМН содержит две малеимидные функциональные группы, которые взаимодействуют специфически с содержащими сульфгидрил соединениями в мягких условиях (рН 6,5-7,7). Две малеимидные группы соединены углеводородной цепью. Таким образом, ВМН можно применять для необратимого перекрестного сшивания белков (или полипептидов), которые содержат остатки цистеина. Перекрестносшивающие агенты могут быть также гетеробифункциональными. Гетеробифункциональные перекрестносшивающие агенты имеют две различные функциональные группы, например амино-реактивную группу и тиол-реактивную группу, которые могут перекрестно сшивать два белка, имеющие свободные амины и тиолы соответственно. Примерами гетеробифункциональных перекрестносшивающих агентов являются сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сложный малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир (MBS) и сукцинимид-4-(п-малеимидофенил)бутират (SMPB) и аналог с удлиненной цепью MBS. Сукцинимидильная группа указанных перекрестносшивающих агентов взаимодействует с первичным амином, тиол-реактивный малеимид образует ковалентную связь с тиолом остатка цистеина. Поскольку перекрестносшивающие агенты часто обладают низкой растворимостью в воде, гидрофильный остаток, такой как сульфонатная группа, можно добавлять к перекрестносшивающему агенту для повышения его растворимости в воде. Сульфо-MBS и сульфо-SMCC являются примерами перекрестносшивающих агентов, модифицированных для растворимости в воде. Многие перекрестносшивающие агенты образуют конъюгат, который практически не расщепляется в условиях клетки. Таким образом, некоторые перекрестносшивающие агенты содержат ковалентную связь, такую как дисульфид, которая может расщепляться в условиях клетки. Например, реагент Траута, дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP) и N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) являются хорошо известными расщепляемыми перекрестносшивающими агентами. Применение расщепляемого перекрестносшивающего агента позволяет проникающему в клетку пептиду, по меньшей мере одному антигену или антигенному эпитопу и по меньшей мере одному пептидному агонисту TLR, которые образуют комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, отделяться друг от друга после их доставки в клетку-мишень. Для этой цели можно применять также прямую дисульфидную связь. Химическое перекрестное сшивание может включать также применение спейсерных плечей. Спейсерные плечи обеспечивают внутримолекулярную гибкость или позволяют регулировать внутримолекулярные расстояния между конъюгированными фрагментами и поэтому могут способствовать сохранению биологической активности. Спейсерное плечо может находиться в форме белкового (или полипептидного) фрагмента, который включает спейсерные аминокислоты, например, пролин. Альтернативно этому, спейсерное плечо может являться частью перекрестносшивающего агента, такого как "длинноцепочечный SPDP" (фирма Pierce Chem. Co., Рокфорд, шт. Иллинойс, каталожный № 21651 Н). Многочисленные перекрестносшивающие агенты, включая описанные выше, поступают в продажу. Подробные инструкции по их применению доступны от коммерческих поставщиков. Более подробную информацию о перекрестном сшивании белков и получении конъюгатов, которые можно применять в контексте связывания компонентов а), б) и в), образующих комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно почерпнуть из: Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, изд-во CRC Press, 1991.

Перекрестносшивающие агенты для перекрестного сшивания пептида или белка включают, например, (I) агенты, обеспечивающие перекрестное сшивание по типу амин-амин, например гомобифункциональные аминокислотные белковые перекрестносшивающие реагенты на основе реактивных групп сложного NHS-эфира и сложного имидоэфира для селективной конъюгации первичных аминов; доступны в виде коротких, длинных, расщепляемых, необратимых, проникающих через мембраны и находящихся на клеточной поверхности вариантов; (II) агенты, обеспечивающие перекрестное сшивание по типу сульфгидрил-углевод, например перекрестносшивающие реагенты на основе реактивных групп малеимида и гидразида для конъюгации и образования ковалентных перекрестных связей; (III) агенты, обеспечивающие перекрестное сшивание по типу сульфгидрил-сульфгидрил, например гомобифункциональные сульфгидрил-специфические перекрестносшивающие реагенты на основе реактивных групп малеимида или пиридилдитиола для избирательной ковалентной конъюгации тиолов белка и пептида (восстановленные цистеины) для образования стабильных тиоэфирных связей; (IV) фотореактивные перекрестносшивающие агенты, например арилизид, диазириин и другие фотореактивные (активируемые светом) химические гетеробифункциональные перекрестносшивающие агенты для конъюгации белков, нуклеиновых кислот и других молекулярных структур, участвующих в образовании комплексов рецептор-лиганд посредством двухстадийной активации; (V) агенты, обеспечивающие перекрестное сшивание по типу амин-сульфгидрил, например гетеробифункциональные перекрестносшивающие агенты для белков для конъюгации между первичным амином (лизин) и сульфгидрильными (цистеин) группами белков

и других молекул; доступны со спейсерными плечами различной длины и типов; и (VI) агенты, обеспечивающие перекрестное сшивание по типу карбоксил-амин, например, перекрестносшивающие реагенты на основе карбодимидов, DCC и EDC (EDAC), для конъюгации карбоксильных групп (глутамат, аспарат, С-концы) с первичными аминами (лизин, N-концы), а также N-гидроксисукцинимид (NHS) для стабильной активации карбоксилатов для конъюгации с амином.

В целом, примеры перекрестносшивающих агентов, которые можно применять в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, включают сложный N-(α -малеимидоацетокси)сукцинимидиловый эфир, N-5-азидо-2-нитробензилоксисукцинимид, 1,4-бисмалеимидобутан, 1,4-бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан, бисмалеимидогексан, бисмалеимидоэтан, гидразид N-(β -малеимидопропионовой кислоты) \times ТРА, сложный N-(β -малеимидопропилокси)сукцинимидиловый эфир, 1,8-бисмалеимидодиэтиленгликоль, 1,11-бисмалеимидотриэтиленгликоль, бис(сульфосукцинимидил)суберат, бис(сульфосукцинимидил)глутарат-d0, бис(сульфосукцинимидил)-2,2,4,4-глутарат-d4, бис(сульфосукцинимидил)суберат-d0, бис(сульфосукцинимидил)-2,2,7,7-суберат-d4, бис(NHS)ПЭГ5, бис(NHS)ПЭГ9, бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон, N,N-дициклогексилкарбодимид, 1-5-дифтор-2,4-динитробензол, диметиладипимидат \times HCl, диметилпимелимидат \times 2HCl, диметилсуберимидат \times 2HCl, дисукцинимидилглутарат, дитиобис(сукцинимидилпропионат) (реагент Ломанта), дисукцинимидилсуберат, дисукцинимидилтарtrat, диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат \times 2HCl, дитиобисмалеимидоэтан, 3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат), гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинат), N- ϵ -малеимидокапроновую кислоту, гидразид N-(δ -малеимидокапроновой кислоты), сложный N-(ϵ -малеимидокапроилокси)сукцинимидиловый эфир, N-(γ -малеимидобутирилокси)сукцинимидиловый эфир, гидразид N-(κ -малеимидоундекановой кислоты), NHS-LC-диазириин, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксии(6-амидокапроат), сукцинимидил-6-(3'-[2-пиридилтио]пропионамидо)гексаноат, L-фотолейцин, L-фотометионин, сложный м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидиловый эфир, гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты \times HCl, 2-[N2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)-N6-(6-биотинамидокапроил)-L-лизинил]этилметантиосульфат, 2-{N2-[N6-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)-N6-(6-биотинамидокапроил)-L-лизинил]}этилметантиосульфат, N-гидроксисукцинимид, сложный N-гидроксисукцинимидиловый эфир этаназида, сложный N-гидроксисукцинимидиловый эфир тетраоксапентадеканазиды, сложный N-гидроксисукцинимидиловый эфир додекаоксанонатриаконтаназида, NHS-фосфин, 3-(2-пиридилтио)пропионилгидразид, 2-пиридилдитиолтетраоксатетрадекан-N-гидроксисукцинимид, 2-пиридилдитиолтетраоксактатриаконтан-N-гидроксисукцинимид, N-(ρ -малеимидофенил)изоцианат, сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат, NHS-диазириин, NHS-SS-диазириин, N-сукцинимидилйодацетат, N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат, сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, NHS-ПЭГ2-малеимид, NHS-ПЭГ4-малеимид, NHS-ПЭГ6-малеимид, NHS-ПЭГ8-малеимид, NHS-ПЭГ12-малеимид, NHS-ПЭГ24-малеимид, сукцинимидил-4-(ρ -малеимидофенил)бутират, сукцинимидил-6-(β -малеимидопропионамидо)гексаноат, 4-сукцинимидилоксикарбонилметил- α -(2-пиридилдитио)толуол, сукцинимидил-(4-псорален-8-илокси)бутират, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, этиленгликоль-бис(сульфосукцинимидилсукцинат), сложный N-(ϵ -малеимидокапроилокси)сульфосукцинимидиловый эфир, сложный N-(γ -малеимидобутилокси)сульфосукцинимидиловый эфир, сложный N-(κ -малеимидоундеканоилокси)сульфосукцинимидиловый эфир, сульфо-NHS-LC-диазириин, сульфосукцинимидил-6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат, сложный м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимидиловый эфир, N-гидроксисукцинимид, сульфо-NHS-фосфин, сульфосукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат, сульфо-NHS-(2-6-[биотинамидо]-2-(ρ -азидобензамид), сульфо-NHS-диазириин, сульфо-NHS-SS-диазириин, сульфосукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат, сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, сульфосукцинимидил-4-(ρ -малеимидофенил)бутират, трис(2-малеимидоэтил)амин (трехфункциональный) и трис(сукцинимидиламино)триацетат (трехфункциональный).

Связь между двумя из трех компонентов а), б) и в) в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, может быть прямой или косвенной, т.е. два компонента соединены, или они могут быть связаны с помощью дополнительного компонента комплекса, например, спейсера или линкера.

Предпочтительно реализацией прямой связи является амидный мостик, если подлежащие связыванию компоненты имеют реактивные аминогруппы или карбоксильные группы. Более конкретно, если подлежащие связыванию компоненты представляют собой пептиды, полипептиды или белки, то предпочтительной является пептидная связь. Указанную пептидную связь можно создавать с помощью химического синтеза, включающего оба подлежащих связыванию компонента (N-конец одного компонента и С-конец другого компонента), или можно создавать непосредственно путем белкового синтеза полной пептидной последовательности обоих компонентов, при этом оба (белок или пептид) компонента предпочтительно синтезируют на одной стадии. Указанные методы белкового синтеза включают (но не ограничиваясь только ими), например, методы жидкофазного пептидного синтеза или методы твердофазного пептидного синтеза, например методы твердофазного пептидного синтеза Меррифилда, твердофазной пептидной синтез с использованием t-Вос, твердофазной пептидной синтез с использованием Fmoc,

твердофазной пептидный синтез на основе ВОР (гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония) и т.д. Альтернативно этому, предпочтительными являются сложноэфирные или простые эфирные связи.

Кроме того, в частности, если подлежащие связыванию компоненты представляют собой пептиды, полипептиды или белки, то связь можно осуществлять через боковые цепи, например, с помощью дисульфидного мостика. Дополнительные компоненты другой химической природы, например по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, если он не имеет пептидную природу, можно также присоединять к компонентам пептидной природы, к проникающему в клетку пептиду, по меньшей мере одному пептидному агонисту TLR и по меньшей мере одному антигену или антигенному эпитопу, если он имеет пептидную природу. Связь через боковую цепь предпочтительно должна базироваться на аминоклуппах, тиольных или гидроксильных группах боковой цепи, например представлять собой амидную или сложноэфирную или простую эфирную связь. Связь главной пептидной цепи с боковой пептидной цепью другого компонента может представлять собой также изопептидную связь. Изопептидная связь представляет собой амидную связь, которая не присутствует в главной цепи белка. Связь образуется между карбоксильным концом одного пептида или белка и аминоклуппой остатка лизина на другом пептиде или белке (мишень).

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может необязательно содержать спейсер или линкер, представляющие собой неиммунологические фрагменты, которые предпочтительно являются расщепляемыми и которые соединяют компонент а) и б) и/или компонент а) и в), и/или компонент б) и в), и/или соединяют последовательно расположенные антигены или антигенные эпитопы, и/или соединяют последовательно расположенные пептидные агонисты TLR, и/или соединяют последовательно расположенные проникающие в клетку пептиды, и/или которые могут быть помещены в С-концевую область компонентов б) и/или в). Линкер или спейсер предпочтительно могут обладать дополнительными функциональностями помимо способности связывать компоненты, предпочтительно являются расщепляемыми, более предпочтительно расщепляемыми в естественных условиях внутри клетки-мишени, например, расщепляемыми ферментами. Однако указанные другие функциональности не должны, включать, в частности, иммунологические функциональности. Примеры дополнительных функциональностей, в частности касательно линкеров в слитых белках, представлены у Chen X. и др.: Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv. Drug Deliv. Rev. 65(10), 2013, сс. 1357-1369, где описаны также, например, расщепляемые *in vivo* линкеры. Кроме того, у Chen X. и др., Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv. Drug Deliv. Rev. 65(10), 2013, сс. 1357-1369 описаны также различные линкеры, например, гибкие линкеры и жесткие линкеры, и инструменты и базы данных для создания линкеров, которые можно применять в комплексах, предлагаемых в настоящем изобретении, или для создания линкера, который можно применять в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Указанный спейсер может быть пептидным или непептидным, предпочтительно спейсер является пептидным. Предпочтительно пептидный спейсер состоит примерно из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, более предпочтительно примерно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. Аминокислотная последовательность пептидного спейсера может быть идентична последовательности N-концевой или С-концевой фланкирующей области любого из компонентов а), б) или в). Альтернативно этому, пептидный спейсер может состоять из не встречающихся в естественных условиях аминокислотных последовательностей, таких как аминокислотная последовательность, полученная в результате консервативных аминокислотных замен указанных встречающихся в естественных условиях фланкирующих областей, или последовательности известных расщепляемых протеазами сайтов, такие как сайт-мишень для энтерокиназы (аминокислотная последовательность: DDDK, SEQ ID NO: 16), сайт-мишень для фактора Ха (аминокислотная последовательность: IEDGR, SEQ ID NO: 17), сайт-мишень для тромбина (аминокислотная последовательность: LVPRGS, SEQ ID NO: 18), сайт-мишень для протеазы TEV (аминокислотная последовательность: ENLYFQG, SEQ ID NO: 19), сайт-мишень для протеазы PreScission (аминокислотная последовательность: LEVLFQGP, SEQ ID NO: 20), поликатионные аминокислоты, например, сайт-мишень для полиК, фурина (аминокислотная последовательность RX(R/K)R, SEQ ID NO: 21). В конкретном варианте осуществления изобретения пептидный спейсер не должен содержать никаких остатков Cys (C). В предпочтительном варианте осуществления изобретения линкерная последовательность содержит по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 40% и еще более предпочтительно по меньшей мере 50% остатков Gly или β-аланина, например GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 22), GlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 23), GlyGlyGly, CysGlyGly или GlyGlyCys и т.д. Специалист в данной области легко может выбирать и получать приемлемые линкерные последовательности. Они могут состоять из D- и/или L-аминокислот. Другие примеры пептидного спейсера включают аминокислотные последовательности EQLE (SEQ ID NO: 24) или TEWT (SEQ ID NO: 25), или любые их консервативные замены.

Непептидный спейсер может включать или может представлять собой сложный эфир, сложный тиоэфир и дисульфид.

В частности, комплекс, предлагаемый в изобретении, может содержать спейсер или линкер, в частности пептидный спейсер, расположенный между компонентом а) и б) и/или между компонентом а) и в), и/или между компонентом б) и в). Специалист в данной области может выбирать такой пептидный спей-

сер, чтобы он мог отщепляться с помощью присущего клетке механизма после интернализации комплекса, содержащего проникающий в клетку пептид и карго-молекулу.

Когда комплекс содержит несколько антигенов или антигенных эпитопов или когда комплекс содержит несколько пептидных агонистов TLR, то, как должно быть очевидно специалисту в данной области, каждый из антигенов или антигенных эпитопов и/или каждый из пептидных агонистов TLR, входящих в комплекс, предлагаемый в изобретении, могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо связаны через спейсеры или линкеры, такие, например, как пептидный спейсер, состоящий из нескольких аминокислот. Альтернативно этому, когда комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит несколько антигенов или антигенных эпитопов или когда комплекс содержит несколько пептидных агонистов TLR, то также является возможным, что некоторые антигены или антигенные эпитопы и/или некоторые пептидные агонисты TLR, входящие в комплекс, предлагаемый в изобретении, непосредственно связаны друг с другом, а некоторые другие антигены или антигенные эпитопы и/или некоторые другие пептидные агонисты TLR связаны через спейсеры или линкеры, такие, например, как пептидный спейсер, состоящий из нескольких аминокислот.

Например, два последовательно расположенных антигена или антигенных эпитопа или два последовательно расположенных пептидных агониста TLR, которые входят в комплекс, предлагаемый в изобретении, соединены друг с другом с помощью спейсера, состоящего из встречающихся в естественных условиях фланкирующих областей указанных антигенов или антигенных эпитопов или указанных пептидных агонистов TLR соответственно. Например, спейсер, применяемый для соединения первого антигена/антигенного эпитопа или первого пептидного агониста TLR со вторым антигеном/антигенным эпитопом или со вторым пептидным агонистом TLR соответственно, может состоять примерно из вплоть до 8 аминокислот, соответствующих примерно вплоть до 4 аминокислотам N-концевой или C-концевой фланкирующей области первого антигена/антигенного эпитопа или первого пептидного агониста TLR, за которыми расположены примерно вплоть до 4 аминокислот N-концевой или C-концевой фланкирующей области второго антигена/антигенного эпитопа или второго пептидного агониста TLR. В настоящем изобретении в качестве иллюстрации спейсер, применяемый для соединения первого антигена/антигенного эпитопа или первого пептидного агониста TLR ("антиген/эпитоп/пептидный агонист TLR 1") со вторым эпитопом ("антиген/эпитоп/пептидный агонист TLR 2") состоит примерно из 8 аминокислот, соответствующих любой возможной следующей комбинации: от 0 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 8 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, до 8 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и до 0 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, т.е. включая 1 фланкирующую аминокислоту антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 7 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 2 фланкирующие аминокислоты антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 6 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 3 фланкирующие аминокислоты антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 5 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 4 фланкирующие аминокислоты антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 4 фланкирующие аминокислоты антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 5 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 3 фланкирующие аминокислоты антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 6 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 2 фланкирующие аминокислоты антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 7 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 1 фланкирующая аминокислота антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2, 8 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 и 0 фланкирующих аминокислот антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2. Должно быть очевидно, что 8 аминокислот в целом, образующих спейсер, который соединяет два последовательно расположенных антигена/эпитопа/пептидных агониста TLR, не является абсолютной величиной, и спейсер может состоять в целом, например, из 3 аминокислот, 4 аминокислот, 5 аминокислот, 6 аминокислот, 7 аминокислот, 9 аминокислот или 10 аминокислот. Аналогично этому, комбинации, эквивалентные указанным выше, могут также служить иллюстрацией изобретения в ситуации, когда спейсер состоит из менее чем 8 аминокислот или более чем из 8 аминокислот.

Согласно другой конкретной иллюстрации настоящего изобретения спейсер, применяемый для соединения первого антигена/антигенного эпитопа или первого пептидного агониста TLR ("антиген/эпитоп/пептидный агонист TLR 1") со вторым антигеном/антигенным эпитопом или со вторым пептидным агонистом TLR соответственно ("антиген/эпитоп/пептидный агонист TLR 2"), состоит, например, из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. Более конкретно, указанная спейсерная аминокислотная последовательность может соответствовать 4 аминокислотам N-концевой или C-концевой фланкирующей области антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 1 или антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR 2. Спейсер, описанный выше, может также находиться в С-области последнего антигена/эпитопа/пептидного агониста TLR, входящего в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении.

Методы соединения двух из трех компонентов а), б) и в) подробно описаны в литературе, и они могут зависеть от природы по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа. Например, соединение двух из трех компонентов а), б) и в) можно достигать посредством расщепляемых дисульфидных связей,

получаемых в целом с помощью постадийного твердофазного синтеза или сочетания фрагментов в фазе раствора или на твердой фазе, стабильной амидной, тиазолидиновой, оксимовой и гидразиновой связи, дисульфидной связи, стабильной тиомалеимидной связи, пептидной связи (включая пептидные связи между аминокислотами слитого белка), или электростатических или гидрофобных взаимодействий.

Предпочтительно по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, а также любой необязательный спейсер или линкер, входящий в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, имеют пептидную природу. Более предпочтительно все компоненты комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, например проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, представляющий собой пептид, полипептид или белок, по меньшей мере один пептидный агонист TLR и необязательный пептидный линкер или спейсер, соединены в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, пептидной связью. Таким образом, наиболее предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой пептид, полипептид или белок, такой как слитый белок, например рекомбинантный слитый белок. В этом контексте комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID

NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID

NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 69,

или комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% любой из последовательностей

SEQ ID NO:

26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO:

37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO:

46 или SEQ ID NO: 69

является предпочтительным; комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 27,

SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,

SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 69

или комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% любой из последовательностей

SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID

NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 69,

является более предпочтительным; комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID

NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 69,

или комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% любой из последовательностей

SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ

ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 69,

является еще более предпочтительным; и комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39, SEQ ID

NO: 40, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 69

или комплекс, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% любой из последовательностей

SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID

NO: 41 или SEQ ID NO: 69,

является особенно предпочтительным.

SEQ ID NO: 26:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP
VTYSSPEDGI RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP
LIGIQSTKRY KNRVASRKS SR AKFKQLLQHY REVAAKSSE NDRRLRLKE
SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA
QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

SEQ ID NO: 27:

MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD
AEKRYKNRVA SRKSRAKFKQ LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS
QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPFAKF ASFEAQGALA
NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

SEQ ID NO: 28:

MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRAKFKQ LLQHYREVAA AKSENDRLR
LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPFAKF
ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS
LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 33:

MHHHHHHKRY KNRVASRKS SR AKFKQLLQHY REVAAKESL
KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPFAKF ASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GSSTVHEILC KLSLEGDHST
PPSAYGSVKP YTNFDAE

SEQ ID NO: 34:

MHHHHHHREV AAAKSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAHA
EINEAGREVV GVGALKVPRN QDWLGVPFA KFAFEAQGA LANIAVDKAN

LDVEQLESII NFEKLTEWTG SSTVHEILCK LSLEGDHSTP PSAYGSVKPY
TNFDAE

SEQ ID NO: 37:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP
VTYSSPEDGI RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP
LIGIQSTKRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH
AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFQAQ ALANIAVDKA
NLDVEQLESI INFEKLTEWT GS

SEQ ID NO: 38:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP
VTYSSPEDGI RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP
LIGIQSTREV AAASSENDRLRLLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV
GVGALKVPRN QDWLGVPRFA KFAFQAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII
NFEKLTEWTG S

SEQ ID NO: 39:

KRYKNRVARSRKSRKFKQLLQHYREVAAASSENDRLRLLLKVYHSPSY
AYHQFERRAILNRLVQFIKDRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGS
VKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 40:

KRYKNRVARSRKSRKFKQLLQHYREVAAASSENDRLRLLLKNYRIATFK
NWPFLDCAMEELTVSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYT
NFDAE

SEQ ID NO: 41:

KRYKNRVARSRKSRKFKQLLQHYREVAAASSENDRLRLLKHLELASM
TNMELMSSIVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 46:

RRRRRQRRRVKRISQAVHAAHA EINEAGRVRKRVPRNQDWLRVKRAS
FEAQGALANIAVDKARVKRSINFEKLRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYG
SVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 69:

KRYKNRVARSRKSRKFKQLLQHYREVAAASSENDRLRLLLKLFRAAQL
ANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLE
GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

Расположение компонентов а), б) и в) в комплексе, предлагаемом в изобретении.

Компоненты а), б) и в) могут располагаться в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, в любом порядке.

В частности, если более одного проникающего в клетку пептида, и/или более одного антигена или антигенного эпитопа, и/или более одного пептидного агониста TLR содержатся в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, то несколько проникающих в клетку пептидов могут располагаться не последовательным образом, т.е. по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп (компонент б)) и/или по меньшей мере один пептидный агонист TLR (компонент в)) могут прерывать участок из последовательно расположенных проникающих в клетку пептидов и/или проникающие в клетку пептиды могут чередоваться с компонентом б) и/или компонентом в). Аналогично этому несколько антигенов или антигенных эпитопов могут располагаться не последовательным образом, т.е. по меньшей мере один проникающий в клетку пептид (компонент а)) и/или по меньшей мере один пептидный агонист TLR (компонент в)) могут прерывать участок из последовательно расположенных антигенов или антигенных эпитопов и/или антигены или антигенные эпитопы могут чередоваться с компонентом а) и/или компонентом в). Аналогично этому несколько пептидных агонистов TLR могут располагаться не обязательно последовательным образом, т.е. по меньшей мере один проникающий в клетку пептид (компонент а))

и/или по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп (компонент б)) могут прерывать участок из последовательно расположенных пептидных агонистов TLR и/или пептидные агонисты TLR могут чередоваться с компонентом а) и/или компонентом б).

Однако предпочтительно, чтобы несколько проникающих в клетку пептидов располагались в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, последовательным образом и/или несколько антигенов или антигенных эпитопов располагались в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, последовательным образом, и/или несколько пептидных агонистов TLR располагались в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, последовательным образом. Это означает, в частности, что все единичные элементы определенного компонента, т.е. все проникающие в клетку пептиды, все антигены или антигенные эпитопы или все пептидные агонисты TLR, которые содержатся в комплексе, расположены в виде участка, который не прерывается любым из двух других компонентов. Предпочтительнее два других компонента располагаются в комплексе, например, до или после указанного участка из всех единичных элементов указанного конкретного компонента. Однако последовательно расположенные единичные элементы указанного конкретного компонента могут быть связаны друг с другом, например, с помощью указанного в настоящем описании спейсера или линкера, который не является частью двух других компонентов.

Наиболее предпочтительно, чтобы каждый из компонентов а), б) и в) располагался последовательным образом.

Структурно каждый компонент а), б) и в), как правило, содержит одну главную цепь и по меньшей мере одну боковую цепь. Понятие "главная цепь" (синоним "каркасная цепь") в контексте настоящего изобретения относится к главной непрерывной цепи ковалентно связанных атомов в молекуле. Например, в пептидах, полипептидах и белках главная цепь (каркас), как правило, содержит α -атомы углерода и атомы азота, образующие аминокислоты, сцепленные пептидной связью. Каркас не включает боковые цепи. Понятие "боковая цепь" (синоним "концевая (висящая) цепь") в контексте изобретения относится к химической группе, присоединенной к коровой части молекулы, называемой "главной цепью" или каркасом. Например, в пептидах, полипептидах и белках боковые цепи, как правило, представляют собой (основные) части, образующие аминокислоты, которые присоединены к α -атомам углерода каркаса.

В комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, компоненты а), б) и в) могут быть ковалентно связаны через линкер или спейсер, указанный в настоящем описании, или они могут быть непосредственно ковалентно связаны. Вне зависимости от того, применяют ли спейсер или линкер для ковалентного связывания, в принципе существует четыре возможных типа соединения друг с другом двух из трех компонентов в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, а именно:

(I) посредством связи главная цепь/главная цепь,

(II) посредством связи главная цепь/боковая цепь,

(III) посредством связи боковая цепь/главная цепь, или

(IV) посредством связи боковая цепь/боковая цепь. Предпочтительно все три компонента а), б) и в) соединяют посредством связи главная цепь/главная цепь, что позволяет получать, в частности, главную цепь комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, которая содержит главную цепь одного или нескольких проникающего(их) в клетку пептида(ов), главную цепь одного или нескольких антигена(ов) или антигенного(ых) эпитопа(ов) и главную цепь одного или нескольких пептидного(ых) агониста(ов) TLR. Другими словами, главная цепь одного или нескольких проникающего(их) в клетку пептида(ов), главная цепь одного или нескольких антигена(ов) или антигенного(ых) эпитопа(ов) и главная цепь одного или нескольких пептидного(ых) агониста(ов) TLR образуют главную цепь комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, необязательно в сочетании с дополнительными компонентами, например, линкером(ами), спейсером(ами) и т.д. Таким образом, предпочтительными являются следующие расположения компонентов а), б) и в), в частности, если по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп представляет собой пептид, полипептид или белок, где указанные предпочтительные расположения представлены ниже в направлении N-конец \rightarrow C-конец главной цепи комплекса и где все три компонента а), б) и в) связаны посредством связи главная цепь/главная цепь и могут необязательно соединены с помощью линкера, спейсера или другого дополнительного компонента:

(α) компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - компонент в) (по меньшей мере один пептидный агонист TLR);

(β) компонент в) (по меньшей мере один пептидный агонист TLR) - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп);

(γ) компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент в) (по меньшей мере один пептидный агонист TLR) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп);

(δ) компонент в) (по меньшей мере один пептидный агонист TLR) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - компонент а) (проникающий в клетку пептид);

(ϵ) компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент в) (по меньшей мере один пептидный агонист TLR); или

(ζ) компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - компонент в) (по мень-

шей мере один пептидный агонист TLR) - компонент а) (проникающий в клетку пептид).

В частности, если все три компонента а), б) и в) связаны посредством связи главная цепь/главная цепь, то предпочтительно, чтобы по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп располагались на С-конце проникающего в клетку пептида, а проникающий в клетку пептид и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп необязательно были сцеплены с помощью дополнительного компонента, например линкера, спейсера, или с помощью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR. Таким образом, это соответствует варианту расположения, указанному в (α), (β) и (γ), из описанных выше вариантов расположения, т.е. из описанных выше вариантов расположения более предпочтительными являются (α), (β) и (γ).

Еще более предпочтительно по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп располагаются на С-конце проникающего в клетку пептида, при этом проникающий в клетку пептид и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп необязательно сцеплены с помощью дополнительного компонента, например линкера, спейсера, но не с помощью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR. Таким образом, это соответствует варианту расположения, указанному в (α) и (β), из описанных выше вариантов расположения, т.е. из описанных выше вариантов расположения еще более предпочтительными являются (α) и (β). Особенно предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой рекомбинантный полипептид или рекомбинантный белок и компоненты а)-в) располагаются в направлении N-конец \rightarrow С-конец главной цепи указанного комплекса в следующем порядке:

(α) компонент а) - компонент б) - компонент в); или

(β) компонент в) - компонент а) - компонент б),

где компоненты могут быть сцеплены с помощью дополнительного компонента, например линкера или спейсера.

Наиболее предпочтительным является вариант расположения (а), в котором по меньшей мере один агонист TLR содержит или состоит по меньшей мере из одного агониста TLR2, например:

(α 1) компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2;

(α 2) компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2, один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4, и один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5;

(α 3) компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2, и один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4; или

(α 4) компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2, и один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5.

Альтернативно этому, в вариантах расположения, содержащих пептидный агонист TLR2, дополнительные пептидные агонисты TLR могут располагаться в комплексе в других положениях, например:

(α 5) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2;

(α 6) один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2; или

(α 7) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4, и один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2.

Наиболее предпочтительным является вариант расположения (β), в котором по меньшей мере один агонист TLR содержит или состоит по меньшей мере из одного агониста TLR4, например:

(β 1) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп);

(β 2) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) аго-

нист(ов) TLR4, один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2, и один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп);

(β3) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4, и один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп); или

(β4) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4, и один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп).

Альтернативно этому, в вариантах расположения, содержащих пептидный агонист TLR4, дополнительные пептидные агонисты TLR могут располагаться в комплексе в других положениях, например:

(β5) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2;

(β6) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5; или

(β7) один или несколько пептидных агонистов TLR4, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR4 - компонент а) (проникающий в клетку пептид) - компонент б) (по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп) - один или несколько пептидных агонистов TLR2, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR2, и один или несколько пептидных агонистов TLR5, например 1, 2, 3, 4 или 5 пептидный(ых) агонист(ов) TLR5.

Альтернативно этому, только два из трех компонентов а), б) и в) соединяют посредством связи главная цепь/главная цепь в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Например, компоненты а) и б) соединяют посредством связи главная цепь/главная цепь, получая тем самым следующее расположение компонентов а) и б) в комплексе, в направлении N-конец → C-конец главной цепи комплекса, при этом компоненты а) и б) необязательно могут быть сцеплены с помощью дополнительного компонента, например линкера, спейсера и т.д.:

(1) проникающий в клетку пептид (а) - антиген/антигенный эпитоп (б); или

(2) антиген/антигенный эпитоп (б) - проникающий в клетку пептид (а). В таком случае компонент в), т.е. по меньшей мере один пептидный агонист TLR, затем можно соединять посредством связи главная цепь/боковая цепь, посредством связи боковая цепь/главная цепь или посредством связи боковая цепь/боковая цепь либо с проникающим в клетку пептидом (а), либо с антигеном/антигенным эпитопом (б), либо, если он присутствует, с дополнительным компонентом типа спейсера или линкера, который может, например, находиться между проникающим в клетку пептидом (а) и антигеном/антигенным эпитопом (б). Это предусматривает следующие варианты расположения:

(I) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с компонентом а), т.е. главная цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью проникающего в клетку пептида;

(II) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с компонентом а), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью проникающего в клетку пептида;

(III) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с компонентом а), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью проникающего в клетку пептида;

(IV) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с компонентом б), т.е. главная цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа;

(V) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с компонентом б), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа;

(VI) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с компонентом б), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа;

(VII) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом а) и компонентом б), т.е. главная цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом б);

(VIII) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом а) и компонентом б), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом б); или

(IX) компонент в) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом а) и компонентом б), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного пептидного агониста TLR ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом б).

Например, компоненты б) и в) соединяют посредством связи главная цепь/главная цепь, получая тем самым следующее расположение компонентов б) и в) в комплексе, в направлении N-конец → С-конец главной цепи комплекса, при этом компоненты б) и в) необязательно могут быть сцеплены с помощью дополнительного компонента, например, линкера, спейсера и т.д.:

(3) антиген/антигенный эпитоп (б) - пептидный агонист TLR (в); или

(4) пептидный агонист TLR (в) - антиген/антигенный эпитоп (б).

В таком случае компонент а), т.е. проникающий в клетку пептид, затем можно соединять посредством связи главная цепь/главная цепь, посредством связи боковая цепь/главная цепь или посредством связи боковая цепь/боковая цепь либо с антигеном/антигенным эпитопом (б), либо с пептидным агонистом TLR (в), либо, если он присутствует, с дополнительным компонентом типа спейсера или линкера, который может, например, находиться между антигеном/антигенным эпитопом (б) и пептидным агонистом TLR (в). Это предусматривает следующие варианты расположения:

(X) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с компонентом б), т.е. главная цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа;

(XI) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с компонентом б), т.е. боковая цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа;

(XII) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с компонентом б), т.е. боковая цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа;

(XIII) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с компонентом в), т.е. главная цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR;

(XIV) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с компонентом в), т.е. боковая цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR;

(XV) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с компонентом в), т.е. боковая цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR;

(XVI) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом б) и компонентом в), т.е. главная цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом б);

(XVII) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом б) и

компонентом в), т.е. боковая цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом б) и компонентом в); или

(XVIII) компонент а) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом б) и компонентом в), т.е. боковая цепь проникающего в клетку пептида ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом б) и компонентом в).

Например, компоненты а) и в) соединяют посредством связи главная цепь/главная цепь, получая тем самым следующее расположение компонентов б) и в) в комплексе, в направлении N-конец→ С-конец главной цепи комплекса, при этом компоненты а) и в) необязательно могут быть сцеплены с помощью дополнительного компонента, например, линкера, спейсера и т.д.:

(5) проникающий в клетку пептид (а) - пептидный агонист TLR (в); или

(6) пептидный агонист TLR (в) - проникающий в клетку пептид (а).

В таком случае компонент б), т.е. по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, затем можно соединить посредством связи главная цепь/главная цепь, посредством связи боковая цепь /главная цепь или посредством связи боковая цепь/боковая цепь либо с проникающим в клетку пептидом (а), либо с пептидным агонистом TLR (в), либо, если он присутствует, с дополнительным компонентом типа спейсера или линкера, который может, например, находиться между проникающим в клетку пептидом (а) и пептидным агонистом TLR (в). Это предусматривает следующие варианты расположения:

(XIX) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с компонентом а), т.е. главная цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью проникающего в клетку пептида;

(XX) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с компонентом а), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью проникающего в клетку пептида;

(XXI) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с компонентом а), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью проникающего в клетку пептида;

(XXII) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с компонентом в), т.е. главная цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR;

(XXIII) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с компонентом в), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR;

(XXIV) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с компонентом в), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR;

(XXV) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи главная цепь/боковая цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом а) и компонентом в), т.е. главная цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом в);

(XXVI) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/главная цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом а) и компонентом в), т.е. боковая цепь по меньшей мере по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с главной цепью линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом в); или

(XXVII) компонент б) может быть соединен - необязательно через спейсер или линкер - посредством связи боковая цепь/боковая цепь с линкером или спейсером, расположенным между компонентом а) и компонентом в), т.е. боковая цепь по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа ковалентно связана - необязательно через спейсер или линкер - с боковой цепью с линкера или спейсера, расположенного между компонентом а) и компонентом в).

Альтернативно этому, также можно в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, все три компонента а), б) и в) располагать посредством связи главная цепь/боковая цепь, связи боковая цепь/главная цепь или связи боковая цепь/боковая цепь, необязательно сцепленных с помощью дополни-

тельного компонента, например спейсера или линкера.

Нуклеиновая кислота, кодирующая пептиды и белки комплексов, предлагаемых в изобретении.

Другим объектом настоящего изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, где комплекс представляет собой полипептид или белок. В частности, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который описан выше.

В этом контексте нуклеиновые кислоты предпочтительно содержат одноцепочечные, двухцепочечные или частично двухцепочечные нуклеиновые кислоты, предпочтительно выбранные из геномной ДНК, кДНК, РНК, siРНК, антисмысловой ДНК, антисмысловой РНК, рибозима, комплементарных последовательностей РНК/ДНК со способствующими экспрессии элементами или без них, минигена, генных фрагментов, регуляторных элементов, промоторов и их комбинаций.

Предпочтительно изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей комплекс, который представляет собой, в частности, полипептид или белок, где комплекс, содержащий проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, который представляет собой полипептид или белок, и по меньшей мере один пептидный агонист TLR, где проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп и по меньшей мере один пептидный агонист TLR связаны ковалентно, необязательно с помощью пептидного(ых) спейсера(ов) или линкера(ов), указанного(ых) в настоящем описании. Если более одного антигена или антигенного эпитопа, который представляет собой полипептид или белок, содержится в указанном комплексе, то несколько антигенов или антигенных эпитопов также ковалентно связаны необязательно с помощью пептидного(ых) спейсера(ов) или линкера(ов), указанного(ых) в настоящем описании. Аналогично этому, если более одного пептидного агониста TLR содержится в указанном комплексе, то несколько пептидных агонистов TLR также ковалентно связаны, необязательно с помощью пептидного(ых) спейсера(ов) или линкера(ов), указанного(ых) в настоящем описании.

Особенно предпочтительно, нуклеиновая кислота, предлагаемая в настоящем изобретении, кодирует комплекс, представляющий собой (рекомбинантный) слитый белок, который содержит (а) проникающий в клетку пептид, описанный выше, (б) по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два, более предпочтительно по меньшей мере три, еще более предпочтительно по меньшей мере четыре, особенно предпочтительно по меньшей мере пять, наиболее предпочтительно по меньшей мере шесть антигенов или антигенных эпитопов, описанных выше, предпочтительно расположенных последовательным образом, описанным выше, и (а) по меньшей мере один агонист TLR, описанный выше.

Получение и очистка проникающих в клетку пептидов и комплексов, предлагаемых в изобретении.

Следующим объектом настоящего изобретения является вектор, в частности, рекомбинантный вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, описанную выше.

Понятие "вектор" в контексте настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно к искусственной молекуле нуклеиновой кислоты, т.е. молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в естественных условиях. Вектор в контексте настоящего изобретения можно применять для включения или укрытия требуемой нуклеотидной последовательности. Указанные векторы могут представлять собой векторы для хранения, экспрессионные векторы, клонирующие векторы, векторы для переноса и т.д. Вектор для хранения представляет собой вектор, который обеспечивает удобное хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Так, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, требуемому антители или фрагменту антитела, предлагаемому в настоящем изобретении. Экспрессионный вектор можно применять для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например мРНК, или пептидов, полипептидов или белков. Например, экспрессионный вектор может содержать последовательности, необходимые для транскрипции участка последовательности вектора, такие как промоторная последовательность. Клонированный вектор, как правило, представляет собой вектор, который содержит сайт клонирования, который можно использовать для включения нуклеотидных последовательностей в вектор. Клонированный вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор или вектор на основе бактериофага. Вектор для переноса может представлять собой вектор, пригодный для переноса молекул нуклеиновых кислот в клетки или организмы, например вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может представлять собой, например, РНК-вектор или ДНК-вектор. Предпочтительно вектор представляет собой молекулу ДНК. Например, вектор в контексте настоящего описания содержит сайт клонирования, маркер для селекции, такой как фактор, обуславливающий устойчивость к антибиотикам, и последовательность, пригодную для размножения вектора, такую как сайт инициации репликации. Предпочтительно в контексте настоящего описания вектор представляет собой плазмидный вектор. Предпочтительно в контексте настоящего описания вектор представляет собой экспрессионный вектор.

Под объем изобретения подпадают также клетки трансформированные вектором, предлагаемым в настоящем изобретении. Примеры таких клеток включают (но не ограничиваясь только ими) бактериальные клетки, например, *E.coli*, и эукариотические клетки, например клетки дрожжей, клетки животных или клетки растений. В одном из вариантов осуществления изобретения клетки представляют собой клетки млекопитающих, например человека, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, клетки миеломы или клетки

гибридомы. Таким образом, настоящее изобретение относится также к клетке, экспрессирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении; или содержащей вектор, предлагаемый в настоящем изобретении.

В частности, клетку можно трансфектировать вектором, предлагаемым в настоящем изобретении, предпочтительно экспрессионным вектором. Понятие "трансфекция" относится к интродукции молекул нуклеиновых кислот, таких как молекулы ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки. В контексте настоящего изобретения под понятие "трансфекция" подпадает любой известный специалисту в данной области метод интродукции молекул нуклеиновых кислот в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки, например в клетки млекопитающих. Указанные методы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, на основе катионных липидов и/или липосом, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вирусов или трансфекцию на основе катионных полимеров, таких как ДЭАЭ-декстран или полиэтиленгликоль и т.д. Предпочтительно интродукцию осуществляют без применения вирусов.

Можно использовать многочисленные экспрессионные системы, включая (но не ограничиваясь только ими) хромосомы, эписомы и производные вирусов. Более конкретно применяемый вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, в частности рекомбинантный вектор, можно получать из бактериальных плазмид, транспозонов, эписом дрожжей, элементов-вставок, элементов хромосом дрожжей, вирусов, таких как бакуловирус, вирусы папилломы, такие как SV40, вирусы коровьей оспы, аденовирусы, вирусы ветряной оспы, вирусы псевдобешенства, ретровирусы.

Например, указанные векторы, в частности рекомбинантные векторы, могут являться производными как космид, так и фагмид. Нуклеотидную последовательность, в частности нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, можно встраивать в рекомбинантный экспрессионный вектор с помощью методов, хорошо известных специалисту в данной области, таких, например, как методы, описанные в MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook и др., 4-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

Вектор, в частности рекомбинантный вектор, может включать также нуклеотидные последовательности, которые контролируют регуляцию экспрессии, в частности нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, а также нуклеотидные последовательности, обеспечивающие экспрессию, транскрипцию и трансляцию, в частности нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении. Как правило, эти последовательности выбирают в зависимости от применяемых клеток-хозяев.

Так, например, соответствующий секреторный сигнал можно интегрировать в вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, в частности в рекомбинантный вектор, так, чтобы полипептид или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, предлагаемой в настоящем изобретении, направлялся, например, к полости эндоплазматического ретикулума, к периплазматическому пространству, к мембране или к внеклеточному окружению. Выбор соответствующего секторного сигнала может облегчать последующую очистку белка.

Еще одним объектом настоящего изобретения является клетка-хозяин, содержащая вектор, в частности рекомбинантный вектор, предлагаемый в настоящем изобретении.

Интродукцию вектора, в частности рекомбинантного вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, в клетку-хозяина можно осуществлять методами, хорошо известными специалисту в данной области, такими как описанные в BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis и др., 2-е изд., изд-во McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, и MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, выше, включая, например, описанную выше трансфекцию, например с помощью фосфата кальция, ДЭАЭ-декстрана или катионных липидов; микроинъекцию, электропорацию, трансдукцию или заражение.

Клетка-хозяин может представлять собой, например, бактериальные клетки, такие как E.coli, клетки грибов, такие как клетки дрожжей и клетки Aspergillus, Streptomyces, клетки насекомых и/или любые линии клеток, например клетки яичника китайского хомячка (CHO), мышиную клеточную линию C127, клеточную линию ВНК или клетки сирийского хомяка, клетки почки человеческого эмбриона 293 (HEK 293). Предпочтительно клетка-хозяин, предлагаемая в настоящем изобретении, представляет собой клетку млекопитающего, например человека, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, клетки миеломы или гибридомы. В качестве клетки-хозяина наиболее предпочтительными являются дендритные клетки и линии дендритных клеток. Как правило, выбор культуральной среды зависит, в частности, от выбора типа клеток и/или линии клеток, при этом специалист в данной области обладает информацией о приемлемых культуральных средах, пригодных для выбранного типа клеток и/или линии клеток.

Клетки-хозяева можно применять, например, для экспрессии полипептида или белка, в частности комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, на основе вектора и/или нуклеиновой кислоты, предлагаемого/предлагаемой в настоящем изобретении. После очистки стандартными методами полипептида или белка, в частности комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, его можно применять в способе, описанном ниже.

Таким образом, настоящее изобретение относится также к способу получения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, в частности, когда комплекс представляет полипептид или белок. Указанный способ содержит стадии, на которых:

(I) культивируют описанную выше клетку-хозяина в культуральной среде; и
 (II) отделяют комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, от культуральной среды или отделяют комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, от лизата клеток-хозяев после лизиса клеток-хозяев.

Таким образом, комплекс, полученный с помощью указанного способа, предлагаемого в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который представлен в настоящем описании.

Для экстракции белка можно применять поступающие в продажу наборы и/или реагенты, например BugBuster™ фирмы Novagen.

Предпочтительно описанный выше способ получения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, дополнительно включает следующую стадию, на которой:

(III) солибилизируют комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, например, путем ресуспендирования в растворах, содержащих мочевины или гуанидина гидрохлорид (GuHCl), при этом стадию (III) осуществляют после описанной выше стадии (II).

Кроме того, предпочтительно, чтобы описанный выше способ получения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, дополнительно содержал следующую стадию, на которой:

(IV) очищают комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, предпочтительно с помощью одной стадии аффинной хроматографии, при этом стадию (IV) осуществляют после стадии (II) или, если она присутствует, стадии (III), которые описаны выше.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно получать также с помощью методов химического синтеза, например с помощью твердофазного пептидного синтеза.

Очистку указанных пептидов или белков можно осуществлять посредством любого метода, известного в данной области для очистки белков/пептидов. Примеры методов включают ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия и методы, основанные на иммуноаффинности.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен также способ получения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего стадии, на которых:

(I) химически синтезируют указанный комплекс; и

(II) очищают указанный комплекс.

Предпочтительно в способе получения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, комплекс, химически синтезированный на стадии (I) и очищенный на стадии (II), содержит указанные в настоящем описании аминокислотные последовательности проникающего в клетку пептида, указанную в настоящем описании аминокислотную последовательность пептидного агониста TLR и, необязательно, если по меньшей мере один антиген и/или антигенный эпитоп представляет собой пептид или белок, то указанную в настоящем описании аминокислотную последовательность антигена или антигенного эпитопа.

Альтернативно этому, в настоящем изобретении предложен также способ получения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, в котором:

(I) проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный фрагмент и/или по меньшей мере один пептидный агонист TLR синтезируют отдельно;

(II) необязательно проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный фрагмент и/или по меньшей мере один пептидный агонист TLR очищают; и

(III) проникающий в клетку пептид, по меньшей мере один антиген или антигенный фрагмент и/или по меньшей мере один пептидный агонист TLR ковалентно связывают, как описано выше, необязательно с помощью спейсера или линкера или с помощью описанного выше перекрестно сшивающего агента.

Клетки, загруженные комплексами, предлагаемыми в изобретении. Другим объектом настоящего изобретения являются клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении. Например, клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении, представляют собой клетки индивидуума, подлежащего лечению, т.е. клетки, выделенные из индивидуума, подлежащего лечению.

В контексте настоящего изобретения понятие "индивидуум" относится, в частности, к млекопитающим. Например, рассматриваемые в настоящем изобретении млекопитающие включают человека, приматов, одомашненных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади, лабораторные грызуны и т.п. Более предпочтительно понятие "индивидуум" относится к человеку.

В контексте настоящего изобретения понятия "лечение" и "лечить" и т.п., как правило, означают получение требуемого фармакологического и физиологического действия. Действие может быть профилактическим, относящимся к предупреждению или частичному предупреждению заболевания, симптома или состояния, и/или может быть терапевтическим, относящимся к частичному или полному излечиванию заболевания, состояния, симптома или нежелательного явления, связанного с заболеванием. Под понятие "лечение" в контексте настоящего описания подпадает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности у человека, и оно включает: (а) предупреждение возникновения заболевания у индивидуума, который предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не началось, и/или заболевание еще не диагностировано у этого индивидуума, например, профилактическое раннее асимптоматическое вмешательство; (б) ингибирование заболевания, т.е. прекращение или замедление его развития; или (в) ослабление заболевания, т.е. вызывание, по меньшей мере, частичного регресса заболева-

ния и/или по меньшей мере одного из его симптомов или состояний, таких как улучшение или излечение повреждения. В частности, способы, варианты применения, препараты и композиции, предлагаемые в изобретении, пригодны для лечения различных видов рака или инфекционных заболеваний и/или для предупреждения развития различных видов рака до запущенной или метастатической стадии у индивидуумов с ранней стадией рака, улучшая тем самым стадию рака. При применении в случае разных видов рака предупреждение заболевания или нарушения включает предупреждение появления или развития рака у индивидуума, у которого идентифицирован риск развития указанного вида рака, например связанный с известным наличием этого вида рака у родственников индивидуума, и предупреждение заражения стимулирующими опухоль патогенами, такими, например, как вирус Эпштейна-Барра (EBV), вирус папилломы человека (HPV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус герпеса человека типа 8 (HHV8), вирус человеческого Т-клеточного лейкоза типа 1 (HTLV-1), вирус полиомы из клеток Меркеля (MCV) и *Helicobacter pylori*. Под понятия "предупреждение/лечение" рака подпадает также стабилизация или замедление уже диагностированного рака у индивидуума. По "стабилизацией" понимают предупреждение развития рака в запущенную или метастатическую стадию у индивидуумов с ранней стадией рака.

Предпочтительно клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в изобретении, представляет собой антигенпрезентирующую клетку (APC). Предпочтительно антигенпрезентирующие клетки выбирают из группы, состоящей из дендритной клетки (DC), макрофага и В-клетки. Дендритные клетки, в частности дендритные клетки (обычные и/или плазмацитоидные), выделенные из индивидуума, подлежащего лечению, являются более предпочтительными.

Методы выделения антигенпрезентирующих клеток, в частности дендритных клеток, из индивидуума известны специалистам в данной области. Они включают сбор моноцитов или гематопоэтических стволовых клеток из костного мозга, пуповинной крови или периферической крови. Они включают также применения эмбриональных стволовых (ES) клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS). Антигенпрезентирующие клетки, в частности дендритные клетки или их предшественники, можно обогащать методами, которые включают отмучивание и разделение на основе магнитных гранул, которые можно применять для обогащения CD 14⁺-клеток-предшественников.

Методы загрузки комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, в клетки, предпочтительно в вышеуказанные антигенпрезентирующие клетки, более предпочтительно в дендритные клетки, а также методы получения таких клеток перед введением индивидууму, известны специалисту в данной области. Например, получение дендритных клеток может включать их культивирование или дифференцировку с использованием цитокинов, которые могут включать, например, GM-CSF и IL-4. Можно применять также линии дендритных клеток. Загрузка комплекса, предлагаемого в изобретении, в клетки, предпочтительно в APC, более предпочтительно в дендритные клетки, может включать совместную инкубацию комплекса, предлагаемого в изобретении, с клетками в культуре, с использованием свойств, присущих проникающему в клетку пептиду, который содержится в комплексе, предлагаемом в изобретении (т.е. его способности к интернализации). Дополнительное культивирование клеток, например дендритных клеток, загруженных таким образом, может включать для индукции эффективного созревания добавление цитокинов, включая IL-1 β , IL-6, TNF α , ПЭГ2, IFN α , и адьювантов, которые могут включать поли-IC, поли-ICLC (т.е. синтетического комплекса карбоксиметилцеллюлозы, двухцепочечной РНК полиинозиновой-полицитидиловой кислоты и поли-L-лизина), а также агонисты TLR и агонисты NLR (рецепторы, подобные олигонуклеотидсвязывающему домену олигомеризации).

Следующим объектом настоящего изобретения является также визуализация клеток, применяемых для клеточной терапии, таких как стволовые клетки, дендритные клетки, Т-клетки или естественные клетки-киллеры, где клетки загружают комплексом, предлагаемым в изобретении, который может дополнительно содержать визуализирующий агент.

В настоящем изобретении предложен также способ получения клеток, в частности, антигенпрезентирующих клеток, загруженных описанным выше комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, где указанный способ, содержит стадии, на которых:

- (I) трансдуцируют или трансфектируют указанные клетки комплексом, предлагаемым в изобретении;
- (II) культивируют указанные клетки в культуральной среде; и
- (III) отделяют указанные клетки от культуральной среды. Предпочтительно клетки загружают комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, где комплекс представляет собой полипептид или белок.

Предпочтительно клетки, загруженные комплексом(ами), предлагаемым(и) в настоящем изобретении, презентуют по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, содержащийся в указанном комплексе, на клеточной поверхности в контексте ГКГС класса I и/или в контексте ГКГС класса II.

Композиции и наборы, предлагаемые в настоящем изобретении.

Другим объектом изобретения является композиция, которая содержит по меньшей мере один компонент, выбранный из:

- (I) комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше,

(II) нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше,
(III) вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше,
(IV) клетки-хозяина, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше, и
(V) клетки, загруженной комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, которая описана выше.

Предпочтительно композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который описан выше.

Композиция, предлагаемая в изобретении, может также содержать более одного из вышеуказанных компонентов (I)-(V). Например, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать по меньшей мере два различных комплекса, указанных в подпункте (I), по меньшей мере две различные нуклеиновые кислоты, указанные в подпункте (II), по меньшей мере два различных вектора, указанных в подпункте (III), по меньшей мере две различные клетки-хозяева, указанные в подпункте (IV), и/или по меньшей мере две различные клетки, указанные в подпункте (V); например, композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать по меньшей мере два различных комплекса, указанных в подпункте (I), и/или по меньшей мере две различные нуклеиновые кислоты, указанные в подпункте (II).

Например, различные комплексы, указанные в подпункте (I), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться либо компонентом а), т.е. проникающими в клетку пептидами, компонентом б), т.е. антигенами или антигенными эпитопами или поднаборами из нескольких антигенов или антигенных эпитопов, либо компонентом в), т.е. пептидным агонистом TLR или поднабором из нескольких пептидных агонистов TLR; или различные комплексы, указанные в подпункте (I), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться двумя из трех компонентов а), б) и в); или различные комплексы, указанные в подпункте (I), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться всеми тремя компонентами а), б) и в) комплекса. Соответственно различные нуклеиновые кислоты, указанные в подпункте (II), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они кодируют указанные различные комплексы; различные векторы, указанные в подпункте (III), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они содержат указанные различные нуклеиновые кислоты; различные клетки-хозяева, указанные в подпункте (IV), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они содержат указанные различные векторы; и различные загруженные комплексом клетки, указанные в подпункте (V), которые содержатся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они загружены указанными различными комплексами.

В настоящем изобретении предложен также комплекс или клетки, загруженные представленным в настоящем описании комплексом, для применения в качестве лекарственного средства, в частности, вакцины. В частности, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой вакцину.

Таким образом, в изобретении предложена также вакцина, которая содержит по меньшей мере один компонент, выбранный из:

(I) комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше,
(II) нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше,
(III) вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше,
(IV) клетки-хозяина, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше, и
(V) клетки, загруженной комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, которая описана выше.

Предпочтительно вакцина, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит описанный выше комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении.

При этом описанные выше применительно к композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, которые касаются использования более одного компонента (I)-(V), применимы также и к вакцине, предлагаемой в настоящем изобретении.

В контексте настоящего изобретения понятие "вакцина" относится к биологическому препарату, обуславливающему врожденный и/или адаптивный иммунитет, как правило, к конкретному заболеванию, предпочтительно раку. Так, вакцина поддерживает врожденный и/или адаптивный иммунный ответ иммунной системы индивидуума, подлежащего лечению. Например, антиген или антигенный эпитоп комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, как правило, обуславливает или поддерживает адаптивный иммунный ответ у пациента, подлежащего лечению, а пептидный агонист TLR комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, может обуславливать или поддерживать врожденный иммунный ответ.

Предлагаемая в изобретении композиция, в частности предлагаемая в изобретении вакцина, может содержать также указанные ниже фармацевтически приемлемые носитель, адъювант и/или наполнитель для предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции. Согласно конкретному варианту предлагаемой в изобретении композиции, в частности предлагаемой в изобретении вакцины, выбор фармацевтически приемлемого носителя определяется в принципе тем путем, которым вводят предлагаемую в изобретении композицию, в частности, предлагаемую в изобретении вакцину. Предлагаемую в изобре-

нии композицию, в частности предлагаемую в изобретении вакцину, можно применять, например, системно или местно. Пути системного введения, в целом, включают, например, чрескожный, оральный, парентеральный пути, включая подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, внутрикожные и внутрибрюшинные инъекции и/или интраназальный путь введения. Пути местного применения, в целом, включают, например, местное нанесение, но также и внутрикожные, чрескожные, подкожные или внутримышечные инъекции или инъекции внутрь повреждения, внутричерепные, внутрилегочные, внутрисердечные, внутринодальные (внутри лимфатических узлов) и подязычные инъекции. Более предпочтительно предлагаемую в изобретении композицию, в частности, вакцины, можно вводить внутрикожным, подкожным, внутринодальным или внутримышечным путем. Еще более предпочтительно предлагаемую в изобретении композицию, в частности вакцины, можно вводить подкожным, внутринодальным или внутримышечным путем. Особенно предпочтительно предлагаемую в изобретении композицию, в частности вакцины, можно вводить подкожным или внутринодальным путем. Наиболее предпочтительно предлагаемую в изобретении композицию, в частности вакцины, можно вводить внутрикожным путем. Таким образом, предлагаемую в изобретении композицию, в частности предлагаемые в изобретении вакцины, предпочтительно приготавливать в жидкой (или иногда твердой) форме.

Приемлемое количество предлагаемой в изобретении композиции, в частности предлагаемой в изобретении вакцины, подлежащей введению, можно определять с помощью общепринятых экспериментов использованием животных моделей. Такие модели включают (но не ограничиваясь только ими) модели, созданные с использованием кроликов, овец, мышей, крыс, собак и приматов кроме человека. Предпочтительные стандартные лекарственные формы для инъекции включают стерильные растворы воды, физиологического раствора или их смеси. pH таких растворов следует доводить примерно до 7,4. Приемлемые носители для инъекции включают гидрогели, устройства для контролируемого или замедленного высвобождения, полимолочную кислоту и коллагеновые матрицы. Приемлемые фармацевтически приемлемые носители для местного применения включают носители, которые пригодны для применения в лосьонах, кремах, гелях и т.п. Если предлагаемая в изобретении композиция, в частности предлагаемая в изобретении вакцина, предназначена для орального введения, то таблетки, капсулы и т.п. являются предпочтительной стандартной лекарственной формой. Фармацевтически приемлемые носители для получения стандартных лекарственных форм, которые можно использовать для орального введения, известны из существующего уровня техники. Их выбор зависит от вторичных параметров, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не имеют решающего значения для целей настоящего изобретения, и выбор легко может сделать специалист в данной области.

Предлагаемая в изобретении композиция, в частности предлагаемая в изобретении вакцина, может содержать дополнительно одну или несколько вспомогательных субстанций для дополнительного повышения иммуногенности. Тем самым предпочтительно достигается синергетическое действие предлагаемого в изобретении комплекса, указанного выше, и вспомогательной субстанции, которая необязательно может содержаться в предлагаемой в изобретении вакцине, описанной выше. В этой связи в зависимости от различных типов вспомогательных субстанций можно рассматривать различные механизмы. Например, соединения, которые способствуют созреванию дендритных клеток (DC), например липополисахариды, TNF- α или лиганд CD40, образуют первый класс приемлемых вспомогательных субстанций. В целом, в качестве вспомогательной субстанции можно применять любой агент, который влияет на иммунную систему по типу "сигнал опасности" (LPS, GP96 и т.д.), или цитокины, такие как GM-CSF, способствующие усилению и/или воздействию на мишень иммунному ответу, который вырабатывается в ответ на стимулирующий иммунитет адьювант, предлагаемый в изобретении. Наиболее предпочтительными вспомогательными субстанциями являются цитокины, такие как монокины, лимфокины, интерлейкины или хемокины, которые дополнительно способствуют врожденному иммунному ответу, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT- β или TNF- α , факторы роста, такие как hGH.

Следующими добавками, которые можно включать в предлагаемую в изобретении вакцину, являются эмульгаторы, такие, например, как Tween®; смачивающие агенты, такие, например, как лаурилсульфат натрия; красители; придающие вкус агенты, фармацевтические носители; агент для формования таблеток; стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты.

Предлагаемая в изобретении композиция, в частности предлагаемая в изобретении вакцина, может содержать любое дополнительное соединение, для которого известно наличие иммуностимулирующих свойств благодаря аффинности связывания (в качестве лигандов) с человеческими Толл-подобными рецепторами TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, или благодаря аффинности связывания (в качестве лигандов) с мышинными Толл-подобными рецепторами TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 или TLR13.

Другим классом соединений, которые в этом контексте можно добавлять в предлагаемую в изобретении композицию, в частности в предлагаемую в изобретении вакцину, могут являться нуклеиновые кислоты CpG, в частности CpG-РНК или CpG-ДНК. CpG-РНК или CpG-ДНК могут представлять собой

одноцепочечную CpG-ДНК (ssCpG-ДНК), двухцепочечную CpG-ДНК (dsДНК), одноцепочечную CpG-РНК (ssCpG-РНК) или двухцепочечную CpG-РНК (dsCpG-РНК). Нуклеиновая кислота CpG предпочтительно находится в форме CpG-РНК, более предпочтительно в форме одноцепочечной CpG-РНК (ssCpG-РНК). Нуклеиновая кислота CpG предпочтительно содержит по меньшей мере одну или несколько (митогенную(ых)) динуклеотидную(ых) цитозин/гуаниновую(ых) последовательность(ей) (CpG-мотив(ы)). Согласно первой предпочтительной альтернативе по меньшей мере один CpG-мотив в этих последовательностях, в частности С (цитозин) и G (гуанин) CpG-мотива, является неметилированным. Все другие цитозины или гуанины, необязательно содержащиеся в этих последовательностях, могут быть метилированными, либо неметилированными. Однако согласно дополнительной предпочтительно альтернативе С (цитозин) и G (гуанин) CpG-мотива могут присутствовать также в метилированной форме.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен также комплекс, описанный выше, или клетка, загруженная указанным комплексом, или композиция или вакцина, описанная выше, для применения для предупреждения и/или лечения заболеваний или нарушений, включающих, например, разные виды рака, гематологические нарушения, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения и отторжения трансплантатов, предпочтительно рак.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен также комплекс, описанный выше, или клетка, загруженная указанным комплексом, или композиция, описанная выше, для применения в качестве визуализирующей или диагностической композиции.

В настоящем изобретении предложена также фармацевтическая композиция, в частности композиция вакцины, описанная выше, и способ лечения индивидуума, предпочтительно млекопитающего и наиболее предпочтительно человека, который страдает от заболевания или нарушения, в частности от нарушения, которое можно лечить с помощью иммунотерапии, такого как различные виды рака, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения и отторжения трансплантатов.

В частности, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, или по меньшей мере одну клетку, загруженную комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель или любой эксципиент, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области, в частности фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, или по меньшей мере одну клетку, загруженную комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

В качестве дополнительного ингредиента предлагаемая в изобретении фармацевтическая композиция может содержать, в частности, фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель. В контексте настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель, как правило, включает жидкую или нежидкую основу предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции. Если предлагаемая в изобретении композиция находится в жидкой форме, то носитель должен, как правило, представлять собой свободную от пирогенов воду; изотонические соляные или забуференные (водные) растворы, например забуференные фосфатом, цитратом и т.д. растворами. В частности, для инъекции предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции можно использовать воду или предпочтительно буфер, более предпочтительно водный буфер, содержащий натриевую соль, предпочтительно по меньшей мере 30 мМ натриевую соль, кальциевую соль, предпочтительно по меньшей мере 0,05 мМ кальциевую соль, и необязательно калиевую соль, предпочтительно по меньшей мере 1 мМ калиевую соль. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения натриевая, кальциевая и необязательно калиевая соль может находиться в форме их галогенидов, например хлоридов, йодидов или бромидов, в форме их гидроксидов, карбонатов, бикарбонатов или сульфатов и т.д. Примеры натриевых солей включают (но не ограничиваясь только ими), в частности NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, примеры необязательных калиевых солей включают, в частности KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, а примеры кальциевых солей включают, в частности CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Кроме того, в буфере могут содержаться органические анионы вышеуказанных катионов. Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретения указанный выше буфер, который можно применять для целей инъекции, может содержать соль, выбранную из хлорида натрия (NaCl), хлорида кальция (CaCl₂) и необязательно хлорида калия (KCl), при этом помимо хлоридов могут присутствовать дополнительные анионы. CaCl₂ можно заменять также другой солью типа KCl. Как правило, соли в буфере для инъекций присутствуют в концентрации по меньшей мере 30 мМ в случае хлорида натрия (NaCl), по меньшей мере 1 мМ в случае хлорида калия (KCl) и по меньшей мере 0,05 мМ в случае хлорида кальция (CaCl₂). Буфер для инъекций может быть гипертоническим, изотоническим или гипотоническим относительно конкретной референс-среды, т.е. буфер может иметь более высокое, идентичное или более низкое содержание солей относительно конкретной референс-среды, при этом предпочтительно можно применять вышеуказанные соли в таких концентрациях, которые не приводят к повреждению клеток в результате осмоса или других зависящих от концентрации эффектов. Референс-среды представляют собой, например, жидкости, присутствующие в методах "in vivo", такие как кровь, лимфа, цитозольные жидкости или другие жидкости организма или, например, жидкости, которые можно использовать в качестве референс-сред в методах

"in vitro", такие как обычные буферы или жидкости. Такие обычные буферы или жидкости известны специалистам в данной области. Предпочтительными в качестве жидкой основы являются соляной раствор (0,9% NaCl) и лактированный раствор Рингера.

Однако в предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции можно применять также один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей или разбавителей, или капсулирующих соединений, которые можно использовать для введения индивидууму, подлежащему лечению. Понятие "совместимый" в контексте настоящего описания означает, что эти составляющие предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции можно смешивать с указанным выше комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, таким образом, что отсутствует взаимодействие, которое могло бы приводит к существенному снижению фармацевтической эффективности предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции в обычных условиях применения. Фармацевтически приемлемые носители, наполнители и разбавители должны, естественно, иметь достаточно высокую степень чистоты и достаточной низкую токсичность для того, чтобы их можно было бы применять для введения индивидууму, подлежащему лечению. Некоторыми примерами соединений, которые можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или составляющих, являются сахара, такие, например, как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие, например, как кукурузный крахмал или картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие, например, как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы, порошкообразный трагакант; солод, желатин; жир; твердые вещества, обеспечивающие скольжение, такие, например, как стеариновая кислота, стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие, например, как арахисовое масло, масло из семян хлопчатника, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло из теобромы (шоколадное дерево); полиолы, такие, например, полипропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновая кислота.

Предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно вводить орально, парентерально, путем ингаляции спрея, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или с помощью имплантированного резервуара. В контексте настоящего описания понятие парентерально включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, в синовиальную жидкость, надчревную, внутриоболочечную, внутрипеченочную, внутрь повреждения, внутричерепную, чрескожную, внутрикожную, внутрилегочную, внутрибрюшинную, внутрисердечную, внутриартериальную, внутринодальную и подъязычную инъекцию или инфузию. Предпочтительно предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно вводить внутрикожно, внутримышечно, внутринодально или подкожно. Более предпочтительно предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно вводить внутримышечно, внутринодально или подкожно. Еще более предпочтительно предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно вводить внутринодально или подкожно. Наиболее предпочтительно предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно вводить подкожно.

Предпочтительно предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно вводить с помощью парентеральной инъекции, более предпочтительно подкожной, внутривенной, внутрисуставной, внутрь синовиальной жидкости, надчревной, внутриоболочечной, внутрипеченочной, внутрь повреждения, внутричерепной чрескожной, внутрикожной, внутрилегочной, внутрибрюшинной, внутрисердечной, внутриартериальной, внутринодальной и подъязычной инъекции или инфузии. Стерильные инъекционные формы предлагаемых в изобретении фармацевтических композиций могут представлять собой водную или маслянистую суспензию. Эти суспензии можно приготавливать с помощью методов, известных в данной области, с использованием приемлемых диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный инъекционный препарат может также представлять собой стерильный инъекционный раствор или инъекционную суспензию в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе, таком, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых наполнителей и растворителей, которые можно применять, следует упомянуть воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды, как правило, применяют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно применять мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицериды можно применять в препаратах для инъекции в виде встречающихся в естественных условиях фармацевтически приемлемых масел, таких как оливковое масло или касторовое масло, прежде всего в виде их полиоксиэтилированных производных. Эти масляные растворы или суспензии могут содержать также спирт с длинной цепью в качестве разбавителя или диспергирующего агента, такой как карбоксиметилцеллюлоза или аналогичные диспергирующие агенты, которые обычно применяют для приготовления фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Для приготовления предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции можно применять также общепринятые поверхностно-активные вещества, такие как Твины, Спаны и другие эмульгирующие агенты или биологически доступные энхансеры, которые обычно применяют для производства фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в область поражения действующее вещество должно предпочтительно находиться в форме приемлемого для парентерального введения

водного раствора, свободного от пирогенов и имеющего приемлемую величину рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области могут приготавливать приемлемые растворы, используя, например, придающие изотоничность наполнители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактированный раствор Рингера для инъекций. Можно включать при необходимости консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Вне зависимости от того, применяют ли полипептид, пептид или молекулу нуклеиновой кислоты, другое фармацевтически приемлемое соединение, предлагаемое в изобретении, которое следует вводить индивидууму, введение предпочтительно осуществляют в "профилактически эффективном количестве" или "терапевтически эффективном количестве" (в зависимости от ситуации), которое является достаточным для оказания благоприятного воздействия на индивидуума. Фактически вводимое количество и скорость и продолжительность введения должны зависеть от природы и серьезности состояния, подлежащего лечению.

Предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию, указанную выше, можно вводить также орально в виде любой приемлемой для орального введения лекарственной формы, включая (но не ограничиваясь только ими) капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для орального применения общепринятые носители представляют собой лактозу и кукурузный крахмал. Как правило, добавляют также замасливатели, такие как стеарат магния. Для орального введения в форме капсулы приемлемыми разбавителями являются лактоза и безводный кукурузный крахмал. Когда для орального введения требуются водные суспензии, то действующее вещество, т.е. указанный выше предлагаемый в изобретении, транспортер конъюгированной карго-молекулы, указанной выше, объединяют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости можно добавлять определенные подслащивающие вещества, корригенты или красители.

Предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно применять также местно, прежде всего, если мишень обработки включает области или органы, легко доступные для местного нанесения, например, включая заболевания кожи или любой другой доступной эпителиальной ткани. Приемлемые местные препаративные формы легко приготавливать для каждой/каждого из указанных областей или органов. Для местного применения предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно приготавливать в виде приемлемой мази, содержащей предлагаемую в изобретении иммуностимулирующую композицию, в частности ее компоненты, описанные выше, суспендированные или растворенные в одном или нескольких носителях. Носители для местного применения включают (но не ограничиваясь только ими) минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, прлюксипропилен, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно этому, предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно приготавливать в форме приемлемого лосьона или крема. В контексте настоящего изобретения приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, сложные цетиловые эфиры воска, цеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

В этом контексте предписание лечения, например выбор доз и т.д. при применении описанной выше фармацевтической композиции, находится в компетенции обычных практикующих специалистов и других врачей, и, как правило, при этом учитываются нарушения, подлежащее лечению, состояние индивидуального пациента, место введения, метод обработки и другие факторы, известные практикующему специалисту. Примеры упомянутых выше методик и протоколов можно почерпнуть из REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 160-е изд., под ред. Osol A., 1980.

Таким образом, предлагаемая в изобретении фармацевтическая композиция, как правило, содержит в "безопасном и эффективном" количестве компоненты предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции, в частности указанного выше комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, и/или клеток, нагруженных указанным комплексом. В контексте настоящего описания "безопасное и эффективное количество" означает количество комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, которое является достаточным для существенной индукции положительных изменений заболевания или нарушения, т.е. количество комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, или клеток, нагруженных указанным комплексом, которое вызывает биологический или медицинский ответ в рассматриваемой ткани, системе, у животного или человека. Эффективное количество может представлять собой "терапевтически эффективное количество" для облегчения симптомов заболевания или состояния, подлежащего лечению, и/или "профилактически эффективное количество" для профилактики симптомов заболевания или состояния, подлежащего предупреждению. Понятие включает также количество активного комплекса, достаточное для замедления развития заболевания, в частности, для снижения или ингибирования роста опухоли или инфекции, и тем самым вызывает ожидаемый ответ, в частности указанный ответ может представлять собой иммунный ответ, направленный против антигенов или антигенных эпитопов, которые содержатся в комплексе (т.е. "ингибирующее эффективное количество"). Однако в то же время "безопасное и эффективное количество" является достаточно небольшим, чтобы избежать серьезных побочных действий, т.е. обеспечивает разумное соотношение между пользой и риском. Указанные пределы, как правило, определяют разумными медицинскими решениями. "Безопасное и эффективное" количество компонентов предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции, в частности указанного выше комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, должно также варьироваться в зависимости от кон-

кретного состояния, подлежащего лечению, а также возраста и физического состояния пациента, подлежащего лечению, веса тела, общего состояния здоровья, пола, диеты, времени обработки, скорости экскреции, комбинации лекарственных средств, активности конкретных компонентов а), б) и в) описанного выше комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, серьезности состояния, продолжительности лечения, природы сопутствующей терапии, конкретного применяемого фармацевтически приемлемого носителя и аналогичных факторов, которые являются известными и находятся в компетенции соответствующего врача. Предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию можно применять для человека, а также в ветеринарной медицине, предпочтительно в медицине человека, в качестве фармацевтической композиции в целом, или в качестве вакцины.

Фармацевтические композиции, в частности композиции вакцины, или препаративные формы, предлагаемые в изобретении, можно вводить в виде фармацевтической препаративной формы, которая может содержать комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, в любой форме, указанной в настоящем описании.

Понятия "фармацевтическая препаративная форма" и "фармацевтическая композиция" в контексте настоящего изобретения относятся, в частности к препаратам, которые находятся в форме, обеспечивающей биологическую активность действующего(их) вещества(в), таким образом, чтобы оно(и) однозначно проявляло(и) эффективность, и которая не содержит дополнительный компонент, который может обладать токсичностью для индивидуумов, которым должна вводиться указанная препаративная форма.

В контексте настоящего изобретения "эффективность" лечения можно измерять на основе изменений протекания заболевания в ответ на применение, предлагаемое в настоящем изобретении, или на способ, предлагаемый в настоящем изобретении. Например, эффективность лечения рака можно измерять по снижению объема опухоли и/или удлинению времени жизни без прогрессирования, и/или снижению риска рецидива после резекции первичного рака. Более конкретно, при раке, который лечат с помощью иммунотерапии, оценка эффективности может включать спектр клинических картин противоопухолевого ответа на иммунотерапевтические агенты с использованием новых критериев ответа на иммунотерапию (irRC), которые являются адаптацией критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST), и критерии Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (J. Nail. Cancer Inst. 102(18), 2010, сс. 1388-1397). Эффективность предупреждения инфекционного заболевания в конечном счете оценивают с помощью эпидемиологических исследований человеческих популяций, которые часто коррелируют с титрами нейтрализующих антител в сыворотке, и по индукции многофункциональных патогенспецифических Т-клеточных ответов. Доклиническая оценка может включать устойчивость к инфекции после контрольного заражения инфекционным патогеном. Лечение инфекционного заболевания можно оценивать по ингибированию роста патогена или элиминации патогена (и, как следствие, отсутствию поддающегося обнаружению патогена), что коррелирует с патогенспецифическими антителами и/или Т-клеточными иммунными ответами.

Фармацевтические композиции, в частности композиции вакцины, или препаративные формы, предлагаемые в изобретении, можно вводить также в виде фармацевтической препаративной формы, которая может содержать антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении, в любой указанной в настоящем описании форме.

Вакцину и/или композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно приготавливать также в виде фармацевтических композиций и их стандартных доз, в частности, в сочетании с общепринятыми адьювантами, иммуномодулирующим агентом, носителем, разбавителем или эксципиентом, которые описаны выше и будут описаны ниже, в такой форме их можно применять в виде твердых препаратов, таких как таблетки или заполненные капсулы, или в виде жидкостей, таких как растворы, суспензии, эмульсии, эликсиры, или заполненные ими капсулы, все для орального применения, или в форме стерильных инъекционных растворов для парентерального (включая подкожное и внутривенное введение), которые вводят с помощью инъекции или непрерывной инфузии.

В контексте настоящего изобретения, в частности в контексте фармацевтической композиции и вакцин, предлагаемых в настоящем изобретении, основой инъекционных композиций, как правило, является инъекционный стерильный физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор, или другие инъекционные носители, известные в данной области. Указанные фармацевтические композиции и их формы в виде стандартных доз могут содержать ингредиенты в общепринятых пропорциях, с добавлением дополнительных действующих веществ или ингредиентов или без них, и такие стандартные дозы могут содержать в любом пригодном эффективном количестве действующее вещество, в соответствии с предполагаемым диапазоном суточных доз при применении.

Примеры приемлемых адьювантов и/или иммуномодулирующих агентов в контексте настоящего изобретения включают MPL® (фирма Corixa), минералы на основе алюминия, включая производные алюминия (как правило, называемые квасцами), ASO1-4, MF59, фосфат кальция, липосомы, Iscom, полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (полиIC), включая ее стабилизированную форму поли-ICLC (фирма Hiltonol), CpG-олигонуклеотиды, колонистимулирующий фактор гранулоцитомикрофагов (GM-CSF), липополисахарид (LPS), монтанид, сополимер полилактида-полигликолида (PLG), флагеллин, сапонины коры мыльного дерева (QS21), аминокислоты (например,

RC529), два компонента антибактериальных пептидов с синтетическими олигодезоксинуклеотидами (например, IC31), имиквимод, резиквимод, иммуностимулирующие последовательности (ISS), монофосфорил-липид А (MPLA), фибробласт-стимулирующий липопептид (FSL1) и антитела к CD40.

Композиции, в частности фармацевтические композиции и вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, могут представлять собой жидкие препаративные формы, включая (но не ограничиваясь только ими) водные или масляные суспензии, растворы, эмульсии, сиропы и эликсиры. Композиции можно приготавливать также в виде безводного продукта, предназначенного для восстановления водой или другим пригодным наполнителем перед применением. Указанные жидкие препараты могут содержать добавки, включая (но не ограничиваясь только ими) суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, неводные наполнители и консерванты. Суспендирующие агенты включают (но не ограничиваясь только ими) сироп сорбита, метилцеллюлозу, сироп глюкозы/сахара, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные съедобные жиры. Эмульгирующие агенты включают (но не ограничиваясь только ими) лецитин, сорбитанмоноолеат и гуммиарабик. Консерванты включают (но не ограничиваясь только ими) метил- или пропил-пара-гидроксibenзоат и сорбиновую кислоту. Диспергирующие или смачивающие агенты включают (но не ограничиваясь только ими) поли(этиленгликоль), глицерин, бычий сывороточный альбумин, Tween®, Span®.

Композиции, в частности фармацевтические композиции и вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, можно приготавливать также в виде препарата в форме депо, который можно вводить путем имплантации или внутримышечной инъекции.

Композиции, в частности фармацевтические композиции и вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, могут находиться в форме твердых композиций, которые могут иметь форму таблеток или лепешек, которые приготавливают общепринятым образом. Например, таблетки и капсулы для орального введения могут содержать общепринятые эксципиенты, включая (но не ограничиваясь только ими) связывающие агенты, наполнители, замасливатели, разрыхлители и смачивающие агенты. Связывающие агенты включают (но, не ограничиваясь только ими) сироп, гуммиарабик, желатин, сорбит, трагакант, клейкое вещество из крахмала и поливинилпирролидон. Наполнители включают (но не ограничиваясь только ими) лактозу, сахар, микрокристаллическую целлюлозу, кукурузный крахмал, фосфат кальция и сорбит. Замасливатели включают (но не ограничиваясь только ими) стеарат магния, стеариновую кислоту, тальк, полиэтиленгликоль и кремнезем. Разрыхлители включают (но не ограничиваясь только ими) картофельный крахмал и натрий гликолят крахмала. Смачивающие агенты включают (но не ограничиваясь только им) лаурилсульфат натрия. На таблетки можно наносить покрытие с помощью известных в данной области методов.

Композиции, в частности фармацевтические композиции и вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить также в виде форм с замедленным высвобождением или систем для доставки лекарственных форм с замедленным высвобождением.

Кроме того, композиции, в частности фармацевтические композиции и вакцины, предлагаемые в настоящем изобретении, можно адаптировать для доставки путем повторяющегося введения.

Дополнительные материалы, а также методы обработки препаративных форм и т.п., которые можно применять в контексте композиций, в частности фармацевтических композиций и вакцин, предлагаемых в настоящем изобретении, или в контексте их получения, изложены в "части 5 Remington's "The Science and Practice of Pharmacy", 22-е изд., изд-во University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

Следующим объектом настоящего изобретения является способ приготовления фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, включающий стадию смешения комплекса, предлагаемого в изобретении, или клеток, в частности антигенпрезентирующих клеток, загруженных комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемого носителя.

Таким образом, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, и клетку, загруженную комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, можно применять (для приготовления фармацевтической композиции и/или для приготовления вакцины) для предупреждения, лечения и/или облегчения любого из заболеваний или нарушений, указанных в настоящем описании, в частности, тех, которые можно лечить или предупреждать с помощью иммунотерапии, таких как разные виды рака и инфекционные заболевания.

Другим объектом изобретения являются композиции для визуализации или диагностирования ("диагностические композиции"). Еще одним объектом изобретения являются способы доставки визуализирующего агента и способы диагностирования заболевания или нарушения у индивидуума, предпочтительно у млекопитающего и наиболее предпочтительно у человека, для которого ожидается, что он может страдать от медицинского нарушения, в частности, рака, инфекционного заболевания, аутоиммунного нарушения и отторжения трансплантата.

Препаративные формы и пути введения, указанные в настоящем описании для фармацевтических композиций, можно применять также и для визуализирующих или диагностических композиций ("диагностические композиции"), предлагаемых в изобретении.

Следующим объектом настоящего изобретения являются также состоящие из частей наборы, кото-

рые содержат по меньшей мере один из следующих компонентов:

- (I) комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который описан выше,
- (II) нуклеиновую кислоту, предлагаемую в настоящем изобретении, которая описана выше,
- (III) вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, который описан выше,
- (IV) клетку-хозяина, предлагаемую в настоящем изобретении, которая описана выше, и
- (V) клетку, загруженную комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, который описан выше.

В частности, состоящий из частей набор, предлагаемый в изобретении, может содержать более одного компонента (I)-(V). Например, состоящий из частей набор, предлагаемый в настоящем изобретении, может содержать по меньшей мере два различных комплекса, указанных в подпункте (I), по меньшей мере две различные нуклеиновые кислоты, указанные в подпункте (II), по меньшей мере два различных вектора, указанных в подпункте (III), по меньшей мере две различные клетки-хозяева, указанные в подпункте (IV), и/или по меньшей мере две различные клетки, указанные в подпункте (V); например, состоящий из частей набор, предлагаемый в изобретении, может содержать по меньшей мере два различных комплекса, указанных в подпункте (I), и/или по меньшей мере две различные нуклеиновые кислоты, указанные в подпункте (II).

Например, различные комплексы, указанные в подпункте (I), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться либо компонентом а), т.е. проникающими в клетку пептидами, либо компонентом б), т.е. антигенами или антигенными эпитопами или поднаборами из нескольких антигенов или антигенных эпитопов, либо компонентом в), т.е. пептидным агонистом TLR или поднаборами из нескольких пептидных агонистов TLR; или различные комплексы, указанные в подпункте (I), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться двумя из трех компонентов а), б) и в); различные комплексы, указанные в подпункте (I), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться всеми тремя компонентами а), б) и в) комплекса. Соответственно, различные нуклеиновые кислоты, указанные в подпункте (II), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться тем, что они кодируют указанные различные комплексы; различные векторы, указанные в подпункте (III), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться тем, что они содержат указанные различные нуклеиновые кислоты; различные клетки-хозяева, указанные в подпункте (IV), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться тем, что они содержат указанные различные векторы; и различные клетки, загруженные комплексом, указанные в подпункте (V), которые входят в описанный выше состоящий из частей набор, могут отличаться тем, что они загружены указанными различными комплексами.

Различные компоненты состоящего из частей набора могут быть упакованы в один или несколько контейнеров. Указанные выше компоненты могут находиться в лиофилизированной или безводной форме или могут быть растворены в приемлемом буфере. Набор может содержать также дополнительные реагенты, включая, например, консерванты, среды для роста и/или буферы для хранения и/или восстановления вышеуказанных компонентов, промывочные растворы и т.п. Кроме того, состоящий из частей набор, предлагаемый в настоящем изобретении, необязательно может содержать инструкции по применению.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен также набор для вакцинации для лечения, предупреждения и/или стабилизации рака или инфекционного заболевания, который содержит фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, или вакцину, предлагаемую в настоящем изобретении, и инструкции по применению указанной фармацевтической композиции или указанной вакцины.

Таким образом, в настоящем изобретении, предложен также набор, который содержит указанный в настоящем описании комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании вакцину, предлагаемую в настоящем изобретении, и/или указанную в настоящем описании фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении.

Предпочтительно указанный набор содержит листовку-вкладыш в упаковку или листок с инструкцией по применению для лечения рака и/или гематологического нарушения, предпочтительно злокачественной неоплазмы головного мозга или злокачественной неоплазмы лимфоидной ткани, гематопозитической и родственной ткани, наиболее предпочтительно глиобластомы, с помощью указанного в настоящем описании комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, указанной в настоящем описании клетки, предлагаемой в настоящем изобретении, указанной в настоящем описании композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, указанной в настоящем описании вакцины, предлагаемой в настоящем изобретении, и/или указанной в настоящем описании фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении.

Указанный набор можно применять, в частности, в медицине, для предупреждения и/или лечения рака.

Кроме того, композиции и/или состоящие из частей наборы, предлагаемые в настоящем изобрете-

нии, можно применять в методах визуализации и/или для диагностирования заболевания или нарушения, указанного в настоящем описании.

Применение и способы, предлагаемые в изобретении.

Другим объектом настоящего изобретения является применение одного из следующих компонентов: (I) комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, и/или (II) клеток, таких как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении (для приготовления лекарственного средства), для предупреждения, лечения или стабилизации заболевания или нарушения, такого, которое можно лечить с помощью иммунотерапии, включая различные виды рака, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения, гематологические заболевания и отторжения трансплантатов. Таким образом, в настоящем изобретении предложен любой из следующих компонентов: (I) комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, и/или (II) клетки, такие как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, для применения для предупреждения, лечения или стабилизации заболевания или нарушения, такого, которое можно лечить с помощью иммунотерапии, включая различные виды рака, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения, гематологические заболевания и отторжения трансплантатов.

В настоящем изобретении предложен также комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который обеспечивает транспорт и презентацию по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа, содержащегося в комплексе, на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток в контексте ГКГС класса I и/или ГКГС класса II, для применения для вакцинации и/или иммунотерапии.

Другим объектом настоящего изобретения является способ предупреждения, лечения или подавления заболевания или нарушения, которое можно лечить с помощью иммунотерапии, включая различные виды рака, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения, гематологические заболевания и отторжения трансплантатов, где указанный способ включает введение любого одного из следующих компонентов: (I) комплекс, предлагаемый в изобретении, (II) клетки, такие как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении, или (III) фармацевтическая препаративная форма, содержащая компоненты, указанные в (I)-(II), указанному индивидууму.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ вызывания или повышения у индивидуума иммунного ответа против одного или нескольких эпитопов, который зависит от $CD4^+$ -Т-клеток-хелперов и/или цитотоксических $CD8^+$ -Т-клеток, где указанный способ включает введение любого одного из следующих компонентов: (I) комплекс, предлагаемый в изобретении, (II) клетки, такие как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, или (III) фармацевтическая препаративная форма, содержащая компоненты, указанные в (I)-(II), указанному индивидууму.

Иммунный ответ, который зависит от $CD4^+$ - и/или $CD8^+$ -ответа, можно определять по воспалительному ответу, ответу провоспалительных цитокинов, включающему увеличение экспрессии одного или нескольких из мРНК и белков $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ и $IL-2$ относительно уровня до введения соединений, предлагаемых в изобретении. Его можно измерять также по повышению частоты встречаемости или абсолютному количеству антигенспецифических Т-клеток после введения соединений, предлагаемых в изобретении, измеренному по окрашиванию мультимера HLA-пептида, с помощью ELISPOT-анализов, и в опытах по оценке гиперчувствительности замедленного типа. Его можно косвенно оценивать по увеличению титров антигенспецифических антител в сыворотке, которые зависят от антигенспецифических Т-клеток-хелперов.

В изобретении предложен способ вызывания или повышения у индивидуума иммунного ответа против одного или нескольких эпитопов, который ограничен несколькими молекулами ГКГС класса I и/или несколькими молекулами ГКГС класса II, где указанный способ включает введение любого одного из следующих компонентов: (I) комплекс, предлагаемый в изобретении, (II) клетки, такие как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении, или (III) фармацевтическая препаративная форма, содержащая компоненты, указанные в (I)-(II), указанному индивидууму.

Способ вызывания или повышения у индивидуума иммунного ответа против одного или нескольких эпитопов, который ограничен несколькими молекулами ГКГС класса I и/или несколькими молекулами ГКГС класса II, можно оценивать по цитокиновому ответу, включающему увеличение экспрессии одного или нескольких из мРНК и белков $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ и $IL-2$ относительно уровня до введения соединений, предлагаемых в изобретении, после стимуляции *in vitro* Т-клеток индивидуальными пептидами, связывающимися дискретно с молекулами ГКГС класса I и класса II на антигенпрезентирующих клетках. Рестрикцию различными молекулами ГКГС можно подтверждать с помощью антигенпрезентирующих клеток, которые экспрессируют различные молекулы ГКГС, или с помощью блокирующих ГКГС антител. Это можно измерять также по повышению частоты встречаемости или абсолютному количеству антигенспецифических Т-клеток после введения соединений, предлагаемых в изобретении, измеренному по окрашиванию мультимера HLA-пептида, в которых используют мультимеры, объединенные с отдельными молекулами ГКГС.

Предпочтительно в способах вызывания или повышения иммунного ответа против одного или нескольких эпитопов, предлагаемых в настоящем изобретении, иммунный ответ направлен против одного

или нескольких эпитопов ассоциированного с опухолью антигена или опухолеспецифического антигена, такого, например, как комбинация эпитопов глиомы, которые описаны у Novellino и др., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(3), 2005, сс. 187-207 и у Vigneron и др., *Cancer Immun.* 13, 2013, с. 15.

В альтернативном или дополнительном варианте иммунный ответ может быть направлен против нескольких эпитопов антигенного белка патогена.

Представленные в настоящем описании способы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для вызывания или повышения у индивидуума иммунного ответа против одного или нескольких эпитопов, которые ограничены молекулами ГКГС класса I и/или молекулами ГКГС класса II.

В частности, в настоящем изобретении предложен способ лечения рака или инициации, повышения или пролонгирования противоопухолевого ответа у индивидуума, нуждающегося в этом, который включает введение индивидууму комплекса, содержащего

- проникающий в клетку пептид;
- по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп; и
- по меньшей мере один пептидный агонист TLR;
- в котором компоненты а)-в) ковалентно связаны.

В указанном способе индивидууму предпочтительно вводят указанный в настоящем описании комплекс, предлагаемый в изобретении, указанную в настоящем описании клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании вакцину предлагаемую в настоящем изобретении, и/или указанную в настоящем описании фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении.

Предпочтительно индивидуум имеет рак и/или у него диагностирован рак.

Кроме того, в изобретении предложен способ лечения рака и/или гематологического нарушения, предпочтительно злокачественной неоплазмы головного мозга или злокачественной неоплазмы лимфоидной, гематопозитической и родственной ткани, у индивидуума, который нуждается в этом, наиболее предпочтительно глиобластомы, включающий введение индивидууму комплекса, содержащего

- проникающий в клетку пептид;
- по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп; и
- по меньшей мере один пептидный агонист TLR;
- в котором компоненты а)-в) ковалентно связаны.

Таким образом, предпочтительно указанный в настоящем описании комплекс, предлагаемый в изобретении, указанную в настоящем описании клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, указанную в настоящем описании вакцину предлагаемую в настоящем изобретении, и/или указанную в настоящем описании фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, вводят индивидууму.

Другим объектом настоящего изобретения является применение любого из следующих компонентов: (I) комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, и/или (II) клетки, такие как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, для приготвления визуализирующей композиции, предназначенной для применения в методах визуализации, или для получения диагностической композиции ("диагностические композиции"), предназначенной для диагностирования заболевания или нарушения соответственно. Заболевания или нарушения, которые можно диагностировать согласно изобретению, включают те, которые можно лечить с использованием иммунотерапии, например различные виды рака, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения и отторжения трансплантатов. В частности, заболевания, которые можно диагностировать с помощью диагностической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, представляют собой заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с использованием указанного в настоящем описании комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении. Диагностическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один компонент, выбранный из:

- (I) комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше,
- (II) нуклеиновой кислоты, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше,
- (III) вектора, предлагаемого в настоящем изобретении, который описан выше,
- (IV) клетки-хозяина, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше, и
- (V) клетки, загруженной комплексом, предлагаемой в настоящем изобретении, которая описана выше.

Предпочтительно диагностическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит описанный выше комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении.

В частности, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, предлагаемую в изобретении композицию, предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину, или наиболее предпочтительно предлагаемую в изобретении диагностическую композицию можно использовать в диагностике в качестве диагностического инструмента, например в анализах (in vivo или in vitro), например, в иммуноанализах, для обнаружения, прогнозирования, диагностирования или мониторинга упомянутых различных состояний и болезненных состояний, нару-

шений или заболеваний.

Например, анализы (*in vitro*) можно осуществлять путем доставки комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, предлагаемой в изобретении композиции, предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции или предлагаемой в изобретении вакцины или наиболее предпочтительно предлагаемой в изобретении диагностической композиции, к клеткам-мишеням, как правило, выбранным, например из культивируемых клеток животных, человеческих клеток или микроорганизмов, и мониторинга клеточного ответа с помощью биофизических методов, как правило, известных специалистам в данной области. Применяемые для этого клетки, как правило, могут представлять собой культивируемые клетки (*in vitro*), например клетки, выделенные из организма человека или животного, например клетки крови, выделенные из организма человека или животного, или клетки *in vivo*, т.е. клетки, содержащиеся в органах или тканях живых животных или людей, или микроорганизмы, присутствующие в живых животных или людях. Особенно предпочтительными в этом контексте являются так называемые маркеры или метки, которые могут входить в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, и, в частности, в диагностическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении.

Следующим объектом изобретения является способ диагностирования заболевания или нарушения у индивидуума, где способ включает введение любого из компонентов: (I) комплекс, предлагаемый в изобретении, (II) клетки, такие как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении, или (III) фармацевтическая препаративная форма, содержащая компоненты, указанные в (I)-(II), указанному индивидууму или в образце из указанного индивидуума *ex vivo*.

Другим объектом настоящего изобретения является способ визуализации, где способ включает использование *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*, любого из следующих компонентов: (I) комплекса, предлагаемого в изобретении, (II) клеток, таких как антигенпрезентирующие клетки, загруженные комплексом, предлагаемым в изобретении, или (III) фармацевтической препаративной формы, содержащей компоненты, указанные в (I)-(II).

Предпочтительно варианты применения и способы, предлагаемые в настоящем изобретении, включают введение комплекса, предлагаемого в изобретении.

Кроме того, варианты применения и способы, предлагаемые в настоящем изобретении, включают введение нескольких комплексов, клеток или фармацевтических препаративных форм, предлагаемых в изобретении. Например, в вариантах применения и способах, предлагаемых в настоящем изобретении, применяют или вводят по меньшей мере два различных комплекса, при этом каждый комплекс содержит по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп, и указанный антиген или антигенный эпитоп или (если в указанном комплексе содержатся несколько антигенов или антигенных эпитопов) указанный поднабор антигенов или антигенных эпитопов различаются между двумя комплексами.

Например, различные комплексы (I), содержащиеся в описанной выше композиции, могут отличаться либо компонентом а), т.е. проникающими в клетку пептидами, либо компонентом б), т.е. антигенами или антигенными эпитопами, либо поднаборами из нескольких антигенов или антигенных эпитопов, либо компонентом в), т.е. пептидным агонистом TLR или поднабором из нескольких пептидных агонистов TLR; или различные комплексы (I), содержащиеся в композиции описанной выше, могут отличаться двумя из трех компонентов а), б) и в); или различные комплексы (I), содержащиеся в композиции описанной выше, могут отличаться всеми тремя компонентами а), б) и в) комплекса. Соответственно различные нуклеиновые кислоты (II), содержащиеся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они кодируют указанные различные комплексы; различные векторы (III), содержащиеся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они содержат указанные различные нуклеиновые кислоты; различные клетки-хозяева (IV), содержащиеся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они содержат указанные различные векторы; и различные клетки, загруженные комплексом (V), содержащиеся в описанной выше композиции, могут отличаться тем, что они загружены указанными различными комплексами.

Кроме того, в вариантах применения и способах, предлагаемых в настоящем изобретении, клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, могут представлять собой антигенпрезентирующие клетки, в частности дендритные клетки, более предпочтительно дендритные клетки из индивидуума, подлежащего лечению.

Заболевания, подлежащие лечению или предупреждению.

Подразумевается, что понятие "заболевание" в контексте настоящего изобретения, как правило, является синонимом, и его применяют взаимозаменяемо с понятиями "нарушение" и "состояние" (в случае медицинского состояния), и во всех случаях отражает аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, оно, как правило, характеризуется различными признаками или симптомами, и приводит к тому, что человек или животное имеет пониженную продолжительность жизни или пониженное качество жизни.

Заболевания, подлежащие лечению и/или предупреждению, посредством применения комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении; клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемой в изобретении композиции; предла-

гаемой в изобретении фармацевтической композиции или предлагаемой в изобретении вакцины, включают рак, гематологические нарушения, инфекционные заболевания, аутоиммунные нарушения и отторжения трансплантатов. При этом лечение и/или предупреждение рака и инфекционных заболеваний является предпочтительным, а лечение и/или предупреждение рака является более предпочтительным. В случае рака, предпочтительными являются злокачественная неоплазма головного мозга или злокачественная неоплазма лимфоидной ткани, гематопоэтической и родственной ткани, и более предпочтительной является глиобластома.

Предпочтительно комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антиген-презентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно применять для (приготовления лекарственного средства, предназначенного для) профилактики, лечения и/или облегчения рака или опухолевых заболеваний, включая заболевания, вызываемые нарушенным апоптозом, предпочтительно выбранные из акустической невриномы, рака анального канала, астроцитомы, базалиомы, синдрома Бехчета, рака мочевого пузыря, бластом, рака кости, метастазов в головной мозг, опухолей головного мозга, рака головного мозга (глиобластом), рака молочной железы (карциномы молочной железы (carcinoma mamma)), лимфомы Беркитта, карциноидов, рака шейки матки, карциномы ободочной кишки, колоректального рака, карциномы тела матки, краниофарингеом, CUP-синдрома (синдром рака с невыявленным очагом), карциномы эндометрия, рака желчного пузыря, опухолей половых органов, включая различные виды рака мочеполового тракта, глиобластом, глиом, различных видов опухолей головы и шеи, гепатом, гистиоцитарной лимфомы, синдромов или лимфом Ходжкина и некоджкинских лимфом, опухолей гипофиза, рака кишечника, включая опухоли тонкой кишки и желудочно-кишечные опухоли, саркомы Капоши, рака почки, карцином почки, ларингеального рака или рака гортани, лейкозов, включая острый миелолейкоз (AML), эритролейкоз, острый лимфоидный лейкоз (ALL), хронический миелолейкоз (CML) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), опухоли века, рака печени, метастазов в печень, карцином легкого (= рак легкого = бронхиальная карцинома), мелкоклеточных карцином легкого и немелкоклеточных карцином легкого и аденокарцином легкого, лимфом, рака лимфатической системы, злокачественных меланом, карцином молочной железы (= рак молочной железы), медуллобластом, меланом, менингитом, грибовидного микоза, невриномы, обусловленной неопластическими заболеваниями, рака пищевода, карциномы пищевода (= рак пищевода), олигодендроглиомы, рака яичника (= карцинома яичника), карциномы яичника, карциномы поджелудочной железы (= рак поджелудочной железы), рака пениса, рака полового члена, фарингеального рака, опухоли гипофиза, плазмоцитомы, рака предстательной железы (= опухоли предстательной железы), ректальной карциномы, ректальных опухолей, рака почки, карцином почки, ретинобластомы, сарком, болезни Шнеебергера, рака кожи, например меланомы или немеланомного рака кожи, включая базальноклеточные и плоскоклеточные карциномы, а также псориаз, пузырьчатки обыкновенной, опухолей мягких тканей, спиналиомы, рака желудка, тестикулярного рака, рака глотки, тимомы, карциномы щитовидной железы, рака языка, рака мочеиспускательного канала, рака матки, вагинального рака, различных индуцируемых вирусом опухолей, таких, например, как индуцируемые вирусом папилломы карциномы (например, карциномы шейки матки = рак шейки матки), аденокарциномы, индуцируемые вирусом герпеса опухоли (например, лимфома Беркитта, индуцируемая EBV В-клеточная лимфома, карцинома шейки матки), индуцируемые вирусом гепатита В опухоли (печеночноклеточные карциномы), индуцируемые HTLV-1 и HTLV-2 лимфомы, рак вульвы, состояния, связанные с бородавками или обусловленные ими и т.д. В контексте настоящего описания понятия "терапия" и "терапевтический" предпочтительно относятся к достижению, по меньшей мере, определенного минимального физиологического воздействия на живой организм. Например, физиологическое воздействие после введения "терапевтического" противоопухолевого соединения может заключаться в ингибировании роста опухоли или уменьшении размера опухоли, или предупреждении рецидива опухоли. Предпочтительно при лечении рака или неопластического заболевания следует рассматривать соединение, которое ингибирует рост опухоли или уменьшает размер опухоли, или предупреждает рецидив опухоли, как обладающее терапевтической эффективностью. Таким образом, понятие "противоопухолевое лекарственное средство" предпочтительно обозначает любое терапевтическое средство, обладающее терапевтическим действием в отношении опухоли, неопластического заболевания или рака.

Примеры различных видов рака включают рак головного мозга, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак пищевода, рак легкого, рак печени, рак почки, меланому, рак кишечника, карциному легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, хронический миелолейкоз, колоректальную карциному, карциному желудка, карциному эндометрия, миелолейкоз, плоскоклеточную карциному легкого, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, опухоль мочевого пузыря, промиелоцитарный лейкоз, немелкоклеточную карциному легкого, саркому.

Рак может представлять собой солидную опухоль, рак крови или рак лимфатической системы. Рак может быть нематастатическим или метастатическим.

Предпочтительно рак, который требуется предупреждать и/или лечить, представляет собой глиому, более предпочтительно высоко инвазивную мультиформную глиобластому (GBM). Глиомы наиболее

часто образуют первичные опухоли головного мозга у взрослых, при этом мультиформная глиобластома (GBM) сопряжена с наиболее плохим прогнозом. Эта опухоль печально известна своей высокой инвазивностью и агрессивностью. В частности, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно применять в сочетании с существующими подходами к лечению глиомы, более конкретно высоко инвазивной GBM. Т-лимфоциты могут активно выявлять неопластические клетки в головном мозге, и они обладают потенциалом для безопасной элиминации конкретных опухолевых клеток без повреждения окружающих здоровых тканей.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно применять для (приготовления лекарственного средства, предназначенного для) профилактики, лечения и/или облегчения инфекционных заболеваний, предпочтительно вирусных, ретровирусных, бактериальных или протозойных инфекционных заболеваний. Такие инфекционные заболевания, как правило, выбирают из таких заболеваний, как СПИД, сибирская язва, японский энцефалит, бактериальные инфекционные заболевания, такие как выкидыш (воспаление предстательной железы), сибирская язва, аппендицит, боррелиоз, ботулизм, кампилобактериоз, вызываемый бактерией *Campylobacter*, хламидиоз, вызываемый бактерией *Chlamydia trachomatis* (воспаление мочеиспускательного канала, конъюнктивит), холера, дифтерия, дованоз, эпиглоттит, тифозная лихорадка, газовая гангрена, гонорея, кроличья лихорадка, заболевание, вызываемое *Heliobacter pylori*, коклюш, паховый лимфогранулематоз, остеомиелит, болезнь легионеров, ветряная оспа, остроконечная кондилома, заболевание, вызываемое цитомегаловирусом (CMV), лихорадка Денге, весенний менингоэнцефалит (ESME), заболевание, вызываемое вирусом Эбола, простуда, инфекционная эритема (пятая болезнь), ящур, герпес простой типа I, герпес простой типа II, опоясывающий лишай, HSV, инфекционные заболевания, вызываемые паразитами, простейшими или грибами, такие как амебиаз, бильгарциоз, болезнь Шагаса, эхинококкоз, вызываемый цепнем *Echinococcus*, ботриоцефалёз (рыбий солитер), отравление рыбой (сигуатера), лисий солитер, эпидермофития стопы, собачий цепень, кандидоз, дрожжевые грибковые пятна, чесотка, кожный лейшманиоз, лямблиоз (гиаргиз), педикулез, онхоцеркоз (речная слепота), грибковые заболевания, бычий цепень, шистосомоз, свиной цепень, токсоплазмоз, трихомониаз, трипаносомиаз (сонная болезнь), висцеральный лейшманиоз, пеленочный (памперсный) дерматит или карликовый цепень, инфекционная эритема, грипп, саркома Капоши, лихорадка Ласса, лейшманиоз, проказа, листериоз, боррелиоз Лайма, малярия, инфекция, вызываемая вирусом Марбург, корь, менингит, включая бактериальный менингит, контагиозный моллюск, мононуклеоз, свинка, урогенитальный микоплазмоз, неонатальный сепсис (хориоамнионит), нома, инфекция, вызываемая вирусом Норволк, отит среднего уха, паратиф, железистая лихорадка Пфейффера, чума, пневмония, полио (полиомиелит, детская хромота), псевдокруп, бешенство, синдром Рейтера, пятнистая лихорадка Скалистых Гор, вызываемый сальмонеллой паратиф, вызываемый сальмонеллой тиф, SARS (тяжелый острый респираторный синдром), скарлатина, опоясывающий лишай, гепатит, оспа, мягкий шанкр, сифилис, столбняк, трехдневная лихорадка, триппер, болезнь цуцугамуши, туберкулез, тиф, вагинит (кольпит), вирусные заболевания, вызываемые цитомегаловирусом (CMV), ортопоксивирусом натуральной оспы, ортопоксивирусом белой оспы, парапоксивирусом овец, вирусом контагиозного моллюска, вирусом герпеса простого 1, вирусом герпеса простого 2, вирусом герпеса В, варицелла-зостер вирусом, вирусом псевдобешенства, человеческим цитомегаловирусом, человеческим вирусом герпеса 6, человеческим вирусом герпеса 7, вирусом Эпштейна-Барра, человеческим вирусом герпеса 8, вирусом гепатита В, вирусом лихорадки Чикунгунья, вирусом лихорадки О'Ньонг-Ньонг, рубивирусом, вирусом гепатита С, GB-вирусом С, вирусом Западного Нила, вирусом Денге, вирусом желтой лихорадки, вирусом энцефаломиелита овец, вирусом энцефалита Сент-Луис, вирусом японского энцефалита В, вирусом Повассан, FSME-вирусом, SARS, SARS-ассоциированным коронавирусом, человеческим коронавирусом 229Е, человеческим коронавирусом Ос43, торовирусом, человеческим Т-клеточным лимфотропным вирусом типа I, человеческим Т-клеточным лимфотропным вирусом типа II, ВИЧ (СПИД), т.е. вирусом иммунодефицита человека типа 1 или вирусом иммунодефицита человека типа 2, вирусом гриппа, вирусом Ласса, вирусом лимфоцитарного хориоменингита, вирусом Такарибе, вирусом Хунин, вирусом Мачупо, вирусом болезни Борна, вирусом Буньямвера, вирусом калифорнийского энцефалита, вирусом лихорадки Рифт-Валли, вирусом флeботомной лихорадки, вирусом Тоскана, вирусом геморрагической лихорадки Крым-Конго, вирусом Хазара, вирусом Хасан, вирусом Хантаан, вирусом Сеул, вирусом проспекта Хилл, вирусом Пуумала, вирусом Добрава-Белград, вирусом Тула, вирусом Син Номбре, Марбург-вирусом озера Виктория, вирусом Эбола Заир, вирусом Эбола Судан, вирусом Эбола Берег Слоновой Кости, вирусом гриппа А, вирусом гриппа В, вирусом гриппа С, вирусом парагриппа, вирусом кори, вирусом эпидемического паротита, респираторно-синцитиальным вирусом, человеческим метапневмовирусом, индийским вирусом везикулярного стоматита, вирусом бешенства, вирусом Мокола, вирусом Дувенхаге, Европейским лиссавирусом летучих мышей 1+2, Австралийским лиссавирусом летучих мышей, аденовирусами А-Ф, вирусом

папилломы человека, вирусом кондилломы 6, вирусом кондилломы 11, вирусами полиомы, аденоассоциированным вирусом 2, ротавирусами или орбивирусами, вирусом оспы, включая вирус ветряной оспы (варицелла-зостер), и малярийными паразитами (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*), вирусные инфекционные заболевания, такие как СПИД, инфекционные заболевания, такие как остроконечная кондилома, полые бородавки, лихорадка Денге, трехдневная лихорадка, вызываемые вирусом Эбола заболевания, простуда, весенний менингоэнцефалит (FSME), грипп, опоясывающий лишай, гепатит, герпес простой типа I, герпес простой типа II, опоясывающий герпес, грипп, японский энцефалит, лихорадка Ласса, вызываемые вирусом Марбург заболевания, бородавки, лихорадка Западного Нила, желтая лихорадка и т.д.

Примеры инфекционных заболеваний включают заболевания, вызываемые вирусами, бактериями, грибами, простейшими и многоклеточными паразитами. К ним относятся, например, амебиаз, сибирская язва, язва Бурули (*Mycobacterium ulcerans*), ассоциированная с калицивирусами диарея, вызываемая бактерией *Campylobacter* диарея, рак шейки матки (человеческий вирус папилломы), ассоциированные с *Chlamydia trachomatis* заболевания половых органов, холера, геморрагическая лихорадка Крым-Конго, лихорадка Денге, дифтерия, геморрагическая лихорадка Эбола, энтеротоксигенная диарея, вызываемая *Escherichia coli* (ETEC), рак желудка (*Helicobacter pylori*), гонорея, заболевания, ассоциированные со стрептококками группы A, заболевания, ассоциированные со стрептококками группы B, вызываемые палочкой *Haemophilus influenzae* типа B пневмония и инвазивное заболевание, диарея при гепатите A, гепатите B, гепатите C, гепатите E, вызываемые вирусом герпеса простого типа 2 язвы половых органов, ВИЧ/СПИД, анкилостомидоз, грипп, японский энцефалит, лихорадка Ласса, лейшманиоз, лептоспироз, рак печени (гепатит B), рак печени (гепатит C), болезнь Лайма, малярия, геморрагическая лихорадка Марбург, корь, свинка, рак носоглотки (вирус Эпштейна-Барра), вызываемый *Neisseria meningitidis* менингит, ассоциированная с парагриппом пневмония, коклюш, чума, полиомиелит, бешенство, вызываемая респираторным синцитиальным вирусом (RSV) пневмония, лихорадка Рифт-Валли, вызываемая ротавирусом диарея, краснуха, шистосомоз, тяжелый острый респираторный синдром (SARS), шигеллез, оспа, ассоциированные с *Staphylococcus aureus* заболевания, рак желудка (*Helicobacter pylori*), вызываемая стрептококками пневмония и инвазивное заболевание, столбняк, клещевой энцефалит, трахома, туберкулез, туляремия, тифозная лихорадка, ассоциированное с вирусом Западного Нила заболевание, желтая лихорадка.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно применять для (приготовления лекарственного средства, предназначенного для) профилактики, лечения и/или облегчения аутоиммунных нарушений, например аутоиммунных заболеваний ЦНС, аутовоспалительных заболеваний, глютенной болезни; синдрома Шегрена, системной красной волчанки и т.д. Как правило, аутоиммунные заболевания возникают вследствие аномального иммунного ответа организма на субстанции и ткани, которые в норме присутствуют в организме (аутоиммунитет). Заболевание может быть ограничено определенными органами (как, например, в случае аутоиммунного тиреоидита) или может затрагивать конкретную ткань в различных местах (как, например, в случае болезни Гудпасчера, которая может поражать базальную мембрану как в легком, так и в почках). Аутоиммунные заболевания можно классифицировать по соответствующему типу гиперчувствительности: тип I (а именно, крапивница, индуцируемая аутологичной сывороткой), тип II, тип III или тип IV.

Примерами аутоиммунных заболеваний являются синдром Блау, буллезный пемфигоид, рак, болезнь Кастлемена, глютенная болезнь, болезнь Шагаса, хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, хронический рекуррентный многоочаговый остеомиелит, хроническая обструктивная болезнь легких, синдром Черджа-Стросса, рубцовой пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодных агглютининов, дефицит компонента 2 комплемента, контактный дерматит, черепной артериит, синдром CREST, болезнь Крона, синдром Кушинга, болезнь Деркума, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет типа 1, диффузный кожный системный склероз, синдром Дресслера, волчанка, дисконидная красная волчанка, экзема, острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM), болезнь Аддисона, агаммаглобулинемия, амиотрофический боковой склероз (обозначаемый также как болезнь Лу Герига; болезнь моторных нейронов), антифосфолипидный синдром анкилоизирующего спондилита, антисинтезанный синдром, атопический дерматит, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунная кардиомиопатия, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунная болезнь внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунная периферическая невропатия, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунная крапивница, аутоиммунный увеит, болезнь Бало/концентрический склероз Бало, болезнь Бехчета, болезнь Берже, энцефалит Бикерстаффа, эндометриоз, энтезит-ассоциированный артрит, эозинофильный гастроэнтерит, приобретенный буллезный эпидермолиз, эритробластомоз плода, синдром Эванса, фибродисплазия оссифицирующая, фиброзный альвеолит (или идиопатический легочный фиброз), гастрит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, энцефалопатия Хашимото, тиреоидит Хаши-

мото, пемфигоид беременных, гнойный гидраденит, гипогаммаглобулинемия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура), IgA-нефропатия, глазной рубцовый пемфигоид, миозит с тельцами включения, ревматоидный артрит, хроническая воспалительная ревматическая лихорадка, демиелинизирующая полиневропатия, саркоидоз, палиндромный ревматизм, интерстициальный цистит, ювенильная идиопатическая шизофрения, PANDAS (педиатрический артрит, также известный как ювенильный аутоиммунный ревматоидный артрит), синдром Шмидта, нейропсихиатрическая болезнь Кавасаки, другая форма APS (антифосфолипидный синдром), синдром Шнитцлера, паранеопластический мозжечковый миастенический синдром, лейкоцитокластическая сывороточная болезнь, плоский лишай, синдром Шегрена, склерозирующий лишай, синдром Персонэйджа-Тэйнера, IgA-линейная болезнь, болезнь Стилла, пемфигоид обыкновенный (пузырчатка обыкновенная), люпоидный гепатит, аутоиммунный гепатит, синдром негнушегося человека, пернициозная анемия, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром ROEMS, красная волчанка, синдром Свита, симпатическая офтальмия, болезнь Меньера, системная волчанка, первичный билиарный цирроз, синдром Миллера-Фишера, артериит Такаясу, холангит, прогрессирующая воспалительная невропатия, болезнь Муха-Габермана, псориаз, псориатический артрит, гангренозная пиодермия, рассеянный склероз, чистая эритроцитарная аплазия, энцефалит Расмуссена, тяжелая миастения, поперечный миелит, феномен Рейно, микроскопический колит, язвенный колит, миозит, идиопатическое воспалительное заболевание кишечника (IBD), оптический нейромиелит, болезнь Девика и нейромиотония.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно применять для (приготовления лекарственного средства, предназначенного для) профилактики, лечения и/или облегчения гематологических нарушений, которые, как правило, представляют собой нарушения, влияющие главным образом на кровь. При этом предпочтительными являются гематологические злокачественные заболевания.

Примерами гематологических заболеваний являются миелоидные нарушения, включая гемоглобинопатии (врожденная анамалия молекулы гемоглобина или скорости синтеза гемоглобина), такие, например, как серповидно-клеточная болезнь, талассемия, метемоглобинемия; анемии (нехватка эритроцитов или гемоглобина), такие, например, как железодефицитная анемия, мегалобластная анемия, включая дефицит витамина В₁₂, пернициозная анемия и фолатный дефицит, гемолитические анемии (разрушение эритроцитов), включая генетические нарушения мембраны RBC, такие, например, как наследственный сфероцитоз, наследственный эллиптоцитоз и врожденная дисэритропоэтическая анемия, генетические нарушения метаболизма RBC, такие как дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) и дефицит пируваткиназы, иммуноопосредованная гемолитическая анемия (положительный результат прямого теста Кумба), такая как аутоиммунная гемолитическая анемия, включая аутоиммунную гемолитическую анемию с тепловыми антителами (такую как идиопатическая системная красная волчанка (SLE) и синдром Эванса (антитела к тромбоцитам и гемолитические антитела (антитела к антигенам эритроцитов))) и аутоиммунную гемолитическую анемию с Холодовыми антителами (такую как идиопатический синдром Холодовых гемагглютининов, инфекционный мононуклеоз и пароксизмальная холоддовая гемоглобинурия), аллоиммунная гемолитическая анемия, включая гемолитическую болезнь новорожденных (HDN) (такую как Rh болезнь (Rh D), гемолитическая болезнь новорожденных ABO, гемолитическая болезнь новорожденных с анти-Kell антителами, Резус С гемолитическая болезнь новорожденных, Резус Е гемолитическая болезнь новорожденных, и заболевания, связанные с несовместимостью других групп крови (RhC, Rhe, Kid, Duffy, MN, P и др.)), лекарственно-индуцированная иммуноопосредованная гемолитическая анемия, включая индуцированную пенициллином (в высокой дозе) и метилдопой анемию, гемоглобинопатии (а именно, с нестабильным или кристаллическим гемоглобином), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (редкое приобретенное клональное нарушение белков поверхности эритроцитов), прямое физическое повреждение RBC, включая микроангиопатическую гемолитическую анемию и вторичную, обусловленную искусственным(и) сердечным(и) клапаном(ами), апластическая анемия, такая как анемия Фанкони, анемия Даймонда-Блэкфена (наследственная чистая аплазия эритроцитов) и приобретенная чистая аплазия эритроцитов; снижение числа клеток, например миелодиспластический синдром, миелофиброз, нейтропения (снижение числа нейтрофилов), агранулоцитоз, тромбастения Гланцманна и тромбоцитопения (снижение числа тромбоцитов), включая идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП) и индуцируемую гепарином тромбоцитопению (НИТ); миелопролиферативные нарушения (повышенное количество клеток), такие, например, как истинная полицитемия (повышение количества клеток в целом), эритроцитоз (увеличение количества эритроцитов), лейкоцитоз (увеличение количества лейкоцитов), тромбоцитоз (увеличение количества тромбоцитов), и миелопролиферативное нарушение; коагулопатии (нарушения кровообращения и свертываемости крови), такие, например, как тромбоцитоз, рекуррентный тромбоз, диссеминированная внутрисосудистая коагуляция, нарушения свёртывающих белков, включая гемофилию, такую как гемофилия А, гемофилия В (известная также как рождественская болезнь) и гемофилия С, болезнь фон Виллебранда, диссеминированная внутрисосудистая коагуляция, дефицит белка S и ан-

тифосфолипидный синдром, и нарушения тромбоцитов, включая тромбоцитопению, тромбастению Гланцманна и синдром Вискотта-Олдрича. Кроме того, примерами гематологических заболеваний являются также гематологические злокачественные нарушения, включая такие гематологические злокачественные нарушения, как, например, лимфомы, включая болезнь Ходжкина и неходжкинскую лимфому, такую как лимфома Беркитта, анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны селезенки, гепатоселезеночную Т-клеточную лимфому и ангиоиммуобластную Т-клеточную лимфому (AILT), миеломы, такие как множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрёма и плазмацитома, лейкозы, такие как острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический идиопатический миелофиброз (MF), хронический миелогенный лейкоз (CML), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-PLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (В-PLL), хронический нейтрофильный лейкоз (CNL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-LGL) и агрессивный НК-клеточный лейкоз. Кроме того, примерами гематологических заболеваний являются также гематологические заболевания смешанного типа, включая гемохроматоз, асплению, гиперспленизм, такой как болезнь Гоше, моноклональную гаммопатию неясного генеза, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз и синдром Темпи. Кроме того, примерами гематологических заболеваний являются также гематологические нарушения, вторичные относительно негематологических нарушений, включая анемию при хроническом заболевании, инфекционный мононуклеоз, сприд, малярию и лейшманиоз.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину, можно применять для (получения лекарственного средства, предназначенного для) профилактики, лечения и/или облегчения отторжения трансплантата, включая, например, реакцию трансплантат-против хозяина. Отторжение трансплантата включает гиперострое отторжение, острое отторжение и хроническое отторжение трансплантата. Примеры отторжения трансплантата включают реакцию отторжения трансплантата кожи, почки, сердца, легкого, поджелудочной железы, печени, кровяной клетки, костного мозга, роговицы, оторванной в результате несчастного случая конечности, в частности пальцев, руки, ноги, лица, носа, кости, сердечного клапана, кровеносного сосуда или кишечника.

Путь введения.

Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить любым описанным выше путем, в том числе, орально, парентерально, внутривенно, ректально или с помощью комбинации указанных путей введения. Парентеральное введение включает (но не ограничиваясь только ими) внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, подкожное, внутрикожное и внутримышечное введение. Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину предпочтительно можно применять также местным, внутрь опухоли, внутрикожным, подкожным, внутримышечным, интраназальным или внутринодальным путем. Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно применять также в форме импланта, который обеспечивает медленное высвобождение композиций, а также с помощью медленной контролируемой i.v.-инфузии. Например, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить подкожно.

При введении комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении; клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемой в изобретении композиции; предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции или предлагаемой в изобретении вакцины может потребоваться несколько последовательных инъекций. Так, введение можно повторять по меньшей мере два раза, например один раз в качестве инъекций для первичной иммунизации, а затем в качестве бустерных инъекций.

В частности, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить многократно или постоянно. Комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить

множественно или постоянно в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 недели; 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 или 12 месяцев; или 2, 3, 4 или 5 лет.

Кроме того, проникающий в клетку пептид, компоненты а), б) и в), т.е. по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп и по меньшей мере один пептидный агонист TLR, входящие в комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, могут содержаться в различных композициях, которые смешивают перед введением или которые вводят одновременно индивидууму, нуждающемуся в этом.

Согласно одному из подходов комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить пациенту непосредственно, используя описанные выше пути введения, в частности для фармацевтических композиций. Альтернативно этому, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить пациенту с использованием подхода *ex vivo*, например, путем интродукции фармацевтической композиции, вакцины или предлагаемого в изобретении транспортера конъюгированной карго-молекулы, указанного выше, в клетки, предпочтительно аутологичные клетки, т.е. клетки, полученные из организма пациента, подлежащего лечению, и трансплантации этих клеток в подлежащую лечению область у пациента, необязательно, осуществляя сортировку и/или культивирование этих клеток до обработки.

Вводимая индивидууму доза в виде однократной дозы или нескольких доз должна значительно варьироваться в зависимости от различных факторов, включая фармакокинетические свойства, состояния и характеристики индивидуума (пол, возраст, вес тела, состояние здоровья, конституция), степени проявления симптомов, сопутствующей терапии, частоты обработок и требуемого действия.

Как правило, для лечения рака терапевтически эффективная доза комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, составляет от примерно 0,01 до 5 мг на инъекцию, в частности от примерно 0,1 до 2 мг на инъекцию или от примерно 0,01 нмоля до 1 нмоля на инъекцию, в частности от 1 нмоля до 1 ммоля на инъекцию, предпочтительно от 1 мкмоля до 1 ммоля на инъекцию.

Как правило, для лечения рака терапевтически эффективная доза антигенпрезентирующей клетки, загруженной комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, составляют от примерно 0,2 млн клеток до 2 млн клеток на инъекцию.

Комбинированная терапия.

Введение комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении; клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемой в изобретении композиции; предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции или предлагаемой в изобретении вакцины согласно способам и вариантам применения, предлагаемым в изобретении, можно осуществлять индивидуально или в комбинации с соагентом, пригодным для лечения и/или стабилизации заболевания или нарушения, подлежащего лечению или подавлению.

Например, в случае лечения, предупреждения или стабилизации рака, введение фармацевтических композиций согласно способам и вариантам применения, предлагаемым в изобретении, можно осуществлять в комбинации с субстанциями, применяемыми для общепринятой химиотерапии, которые направлены против солидных опухолей, и для контроля возникновения метастазов, или любой другой молекулой, действие которой заключается в запуске запрограммированной гибели клеток, например, с соагентом, выбранным из представителей семейства факторов некроза опухоли, включая (но не ограничиваясь только ими) Fas-лиганд и родственный фактору некроза опухоли (TNF) апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL). Согласно другому варианту осуществления изобретения введение комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении; клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемой в изобретении композиции; предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции или предлагаемой в изобретении вакцины согласно способам и вариантам применения, предлагаемым в изобретении, можно осуществлять параллельно с лучевой терапией.

Под объем изобретения подпадает введение комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении; клетки, такой как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемой в изобретении композиции; предлагаемой в изобретении фармацевтической композиции или предлагаемой в изобретении вакцины, где введение индивидууму осуществляют до, одновременно или последовательно с другими терапевтическими режимами или соагентами, пригодными для лечения и/или стабилизации рака и/или предупреждения рецидива рака (например, режимы с применением нескольких лекарственных средств), в терапевтически эффективном количестве. Указанный комплекс, указанную клетку, композицию, вакцину или фармацевтическую композицию, который/которую вводят одновременно с соагентом, можно вводить в одной и той же или в различных композициях и с помощью одинакового или различных путей введения.

Указанные другие терапевтические режимы или соагенты можно выбирать из группы, состоящей из

лучевой терапии, химиотерапии, хирургии, таргетной терапии (включающей применение малых молекул, пептидов и моноклональных антител) и антиангиогенной терапии. В контексте настоящего описания под антиангиогенной терапией подразумевается введение агента, который прямо или косвенно целенаправленно воздействует на ассоциированную с опухолью сосудистую сеть.

Таким образом, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая препаративная форма, содержащая комплекс, предлагаемый в изобретении, или клетку, предлагаемую в изобретении, в частности, антигенпрезентирующую клетку, предлагаемую в изобретении, объединенная по меньшей мере с одним соагентом, пригодным для лечения и/или стабилизации рака и/или предупреждения рецидива рака, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении; клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка, загруженная комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении; предлагаемую в изобретении композицию; предлагаемую в изобретении фармацевтическую композицию или предлагаемую в изобретении вакцину можно вводить после хирургического вмешательства, при котором удаляют солидные опухоли, в качестве профилактики рецидива и/или метастазов.

Кроме того, введение визуализирующей или диагностической композиции согласно способам и вариантам применения, предлагаемым в изобретении, можно осуществлять индивидуально или в комбинации с соагентом, пригодным для визуализации и/или диагностирования возможного заболевания или нарушения.

Индивидуумы.

Настоящее изобретение можно применять для любого индивидуума, страдающего от любого заболевания или нарушения, в зависимости от специфичности, в частности по меньшей мере одного антигена или антигенного эпитопа, содержащегося в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении. В частности, терапевтический эффект указанного комплекса может проявляться в виде иммунного ответа, направленного против указанных антигенов или антигенных эпитопов, в частности ответа, зависящего от CD4⁺-Т-клеток-хелперов и/или цитотоксических CD8⁺-Т-клеток и/или ограниченного молекулами ГКГС класса I и/или молекулами ГКГС класса II.

Предпочтительно согласно настоящему изобретению индивидуумы представляют собой индивидуумов, которые страдают от рака, например рака головного мозга, ободочной кишки, головы или шеи или рака шейки матки. Более предпочтительно согласно настоящему изобретению индивидуумы представляют собой индивидуумов, которые страдают от рака головного мозга, включая глиому.

Согласно настоящему изобретению индивидуумы предпочтительно подвергались хирургическому удалению опухоли.

Альтернативно этому, согласно настоящему изобретению индивидуумы представляют собой индивидуумов, которые страдают от инфекционного заболевания.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления изобретения, представленными в настоящем описании. Фактически специалистам в данной области после ознакомления с приведенным выше описанием и приведенными ниже чертежами должны стать очевидными различные модификации изобретения, которые можно осуществлять в дополнение к указанным в настоящем описании. Указанные модификации подпадают по объему прилагаемой формулы изобретения.

Все процитированные в настоящем описании ссылки включены в него в качестве ссылок.

Если не указано иное, то все технические и научные понятия, примененные в настоящем описании, имеют общепринятое значение, известное обычному специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при воплощении изобретения на практике или тестировании настоящего изобретения можно применять методы и материалы, сходные или эквивалентные указанным в настоящем описании, ниже описаны приемлемые методы и материалы. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие упомянутые в настоящем описании ссылки полностью включены в него в качестве ссылки. В случае разногласия следует руководствоваться настоящим описанием, включая определения. Кроме того, материалы, методы и примеры представлены только с целью иллюстрации и не направлены на ограничение объема изобретения.

Краткое описание чертежей

Ниже представлено краткое описание прилагаемых чертежей. Чертежи предназначены для более подробной иллюстрации настоящего изобретения. Однако они никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения.

На чертежах показано

на фиг. 1 - полученные в примере 1 данные об экспрессии маркера активации CD40 в полученных из моноцитов человеческой крови дендритных клетках (DC) из одной лейкоцитарной пленки. DC стимулировали 300 нМ EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 или 25 нг/мл LPS в течение 48 ч. Осуществляли также окрашивание изотипа для каждого из условий (данные, полученные для изотипа не представлены на фиг. 1) (один эксперимент);

на фиг. 2 - полученные в примере 1 данные об экспрессии маркера активации CD86 в полученных из моноцитов человеческой крови дендритных клетках (DC) из одной лейкоцитарной пленки. DC стимулировали 300 нМ EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 или нг/мл LPS в течение 48 ч. Осуществляли также ок-

рашивание изотипа для каждого из условий (данные, полученные для изотипа не представлены на фиг. 1) (один эксперимент);

на фиг. 3 - полученные в примере 1 данные об экспрессии маркера активации HLADR в полученных из моноцитов человеческой крови дендритных клетках (DC) из одной лейкоцитарной пленки. DC стимулировали 300 нМ EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 или нг/мл LPS в течение 48 ч. Осуществляли также окрашивание изотипа для каждого из условий (данные, полученные для изотипа не представлены на фиг. 1) (один эксперимент);

на фиг. 4 - полученные в примере 1 данные об экспрессии маркера активации CD83 в полученных из моноцитов человеческой крови дендритных клетках (DC) из одной лейкоцитарной пленки. DC стимулировали 300 нМ EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 или нг/мл LPS в течение 48 ч. Осуществляли также окрашивание изотипа для каждого из условий (данные, полученные для изотипа не представлены на фиг. 1) (один эксперимент);

на фиг. 5 - полученные в примере 2 данные о функциональной ограниченной ГКГС класса I кросс-презентации в мышиной системе *in vitro* с использованием полученных из костного мозга дендритных клеток (BMDC) и спленоцитов из различных трансгенных по TCR мышей. Для этой цели BMDC загружали в течение ночи 300 нМ EDAZ13Mad5, EDAMad5 или Mad5. Осуществляли мониторинг эффективности ограниченной ГКГС класса I презентации эпитопа OVACD8 и эпитопа gp100 через 4 дня с помощью меченных CFSE OT 1-клеток и P-Mel-клеток соответственно. Осуществляли мониторинг эффективности ограниченной ГКГС класса II эпитопа OVACD4 через 4 дня с помощью меченных CFSE OT2-клеток. В качестве контроля BMDC импульсно обрабатывали в течение 1 ч 5 мкМ пептидом (один эксперимент, репрезентативный для 2 отдельных экспериментов);

на фиг. 6 - полученные в примере 3 результаты для групп, обработанных соединениями в дозе 2 нмоля. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2), используя в дозе 2 нмоля EDAMad5 или EDAZ13Mad5. Группу, применяемую в качестве положительного контроля, вакцинировали Mad5 и MPLA (доза, эквивалентная EDA). У мышей брали кровь через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашивание пентамером (3-4 мыши на группу, один эксперимент);

на фиг. 7 - полученные в примере 3 результаты для групп, обработанных соединениями в дозе 10 нмолей. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2) EDAMad5 или EDAZ13Mad5 в дозе 10 нмолей. Группу, применяемую в качестве положительного контроля, вакцинировали Mad5 и MPLA (доза, эквивалентная EDA). У мышей брали кровь через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашивание пентамером (3-4 мыши на группу, один эксперимент);

на фиг. 8 - полученные в примере 3 данные о проценте позитивных по пентамеру CD8⁺-Т-клеток во всех протестированных группах. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2), используя в дозе 10 нмолей EDAMad5 или EDAZ13Mad5. Группу, применяемую в качестве положительного контроля, вакцинировали Mad5 и MPLA (доза, эквивалентная EDA). У мышей брали кровь через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашивание пентамером (3-4 мыши на группу, один эксперимент);

на фиг. 9 - полученные в примере 4 данные о росте опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО); *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 относительно контрольной группы (2-сторонний дисперсионный анализ). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной инъекции EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 или Mad5 и MPLA в дозе 10 нмолей (доза, эквивалентная EDA) *s.c.* в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля;

на фиг. 10 - полученные в примере 4 кривые роста индивидуальных опухолей (у каждой из 7 мышей на группу). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной (*s.c.*) инъекции в дозе 10 нмоль EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 или Mad5 и MPLA (доза, эквивалентная EDA) в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля;

на фиг. 11 - полученная в примере 4 (А) кривая выживаемости для 7 мышей на группу; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 относительно контрольной группы (логранговый критерий) и (Б) кривая периода без развития опухоли для 7 мышей на группу; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 относительно контрольной группы (логранговый критерий);

на фиг. 12 - полученные в примере 5 данные о количестве метастазов в каждой экспериментальной группе. Мышам линии C57BL/6 имплантировали *i.v.* 1×10^5 опухолевых клеток меланомы линии B16-OVA и вакцинировали дважды (d0 и d9) путем подкожной (*s.c.*) инъекции в дозе 2 нмоль EDAZ13Mad5, EDAMad5 или Z13Mad5 + MPLA (доза, эквивалентная EDA) или только MPLA в правую боковую область. Мышей умерщвляли в день 13 и изымали легкие. Количество метастатических очагов подсчитывали в каждом легком. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ (непарный Т-критерий);

на фиг. 13 - полученные в примере 6 данные о количестве метастазов в каждой экспериментальной группе. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (d-21 и d-7) путем подкожной (*s.c.*) инъекции в дозе 2 нмоль EDAZ13Mad5, EDAMad5 или Z13Mad5 + MPLA (доза, эквивалентная EDA) в правую боковую область.

вую область. В день 0 мышам имплантировали *i.v.* 1×10^5 опухолевых клеток меланомы линии B16-OVA. Мышей умерщвляли в день 14 и изымали легкие. Количество метастатических очагов подсчитывали в каждом легком. *, $p < 0,05$. ***, $p < 0,001$ (непарный T-критерий);

на фиг. 14 - результаты, полученные в примере 8. Линии клеток НЕК-hTLR2 высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 0,3, 1 или 3 мкМ AnaxaZ13Mad5 или Z13Mad5Anaxa, и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Для получения положительного контроля использовали 500 нг/мл Pam3CSK4. (А) Добавляли 20 мкл супернатанта в среду для детекции QuantiBlue® и инкубировали при 37°C в течение 1 ч перед определением ОП (620 нм). (Б) Оценивали секрецию IL-8 (с помощью ELISA) в супернатанте;

на фиг. 15 - результаты, полученные в примере 9. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2) в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или AnaxaZ13Mad5. У мышей брали кровь через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашивание пентамером (один эксперимент);

на фиг. 16 - результаты, полученные в примере 9. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2) в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или AnaxaZ13Mad5. У мышей брали кровь через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашивание пентамером (один эксперимент с 4 мышами на группу). *, $p < 0,05$;

на фиг. 17 - полученные в примере 10 данные о росте опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной инъекции в дозе 10 нмоль AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, либо путем совместной *s.c.*-инъекции Z13Mad5 + Pam3CSK4 (доза, эквимолярная Anaxa), в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$;

на фиг. 18 - полученные в примере 10 кривые роста индивидуальных опухолей (7 мышей на группу). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной инъекции в дозе 10 нмоль AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, либо путем совместной *s.c.*-инъекции Z13Mad5 + Pam3CSK4 (доза, эквимолярная Anaxa) в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля;

на фиг. 19 - полученные в примере 10 кривые выживаемости для 7 мышей на группу. Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной инъекции в дозе 10 нмоль AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, либо путем совместной *s.c.*-инъекции Z13Mad5 + Pam3CSK4 (доза, эквимолярная Anaxa) в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ****, $p < 0,0001$ (логранговый критерий);

на фиг. 20 - полученные в примере 11 кривые роста опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) в дозе 2 нмоль путем подкожной инъекции Hp91Z13Mad5, EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA или Z13Mad5 и MPLA (доза, эквимолярная EDA) в правую боковую область. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (2-сторонний дисперсионный анализ в день 23);

на фиг. 21 - полученные в примере 11 индивидуальные кривые роста опухолей (7 мышей на группу). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) в дозе 2 нмоль путем подкожной инъекции Hp91Z13Mad5, EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA или Z13Mad5 и MPLA (доза, эквимолярная EDA) в правую боковую область;

на фиг. 22 - полученные в примере 11 кривые выживаемости всех 7 мышей на группу. На графике показаны медианы выживаемости (m.s.). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (логранговый критерий);

на фиг. 23 - полученные в примере 12 данные о росте опухолей у 7 мышей на группу (среднее значение \pm СКО); ****, $p < 0,0001$ (логранговый критерий). Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной инъекции в правую боковую область Z13Mad5Anaxa в дозе либо 0,5 нмоль, либо 2 нмоль, либо 10 нмоль. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля;

на фиг. 24 - полученные в примере 13 данные о SIINFEKL-специфических CD8-T-клеточных ответах, обнаруженных в крови мышей линии C57BL/6, вакцинированных три раза (один раз в Wk0, один раз в Wk2 и один раз в Wk4) *s.c.*, *i.d.* или *i.m.* с использованием Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль (А) или 2 нмоль (Б). Кровь брали у мышей через 7 дней после 2-й и 3-й вакцинации и осуществляли окрашиванием мультимером (один эксперимент с 4 мышами на группу). *, $p < 0,05$;

на фиг. 25 - полученные в пример 13 данные об экспрессии KLRG1 (А) и экспрессии PD-1 (Б), для анализа которых использовали позитивные по мультимеру CD8-T-клетки (один эксперимент с 4 мышами на группу). В целом, метод состоял в следующем: мышей линии C57BL/6 вакцинировали три раза (один раз в Wk0, один раз в Wk2 и один раз в Wk4) *s.c.*, *i.d.* или *i.m.* с использованием Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль. Кровь брали у мышей через 7 дней после 2-й и 3-й вакцинации и осуществляли FACS-

окрашивание;

на фиг. 26 - полученные в примере 14 данные о SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеточных ответах, обнаруженных у мышей линии C57BL/6, вакцинированных два раза (один раз в Wk0 и один раз в Wk2) внутринодально с использованием Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль. Кровь брали у мышей через 7 дней после 2-й вакцинации и осуществляли окрашиванием мультимером (3 мыши на группу);

на фиг. 27 - полученные в примере 15 данные о проценте позитивных по пентамеру клеток среди CD8-Т-клеток (А и Б; *, $p < 0,05$) и средние геометрические значения для (экспрессии) KLRG1 у позитивных по пентамеру CD8-Т-клеток (В и Г). В целом, метод состоял в следующем: мышей линии C57BL/6 вакцинировали 3 раза (А и В: Wk0, Wk2 и Wk4; Б и Г: Wk0, Wk2 и Wk8) s.c. с использованием Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль. У мышей брали кровь через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашиванием пентамером (один эксперимент, 4 мыши на группу);

на фиг. 28 - полученные в примере 15 данные о проценте позитивных по мультимеру клеток среди CD8-Т-клеток (А и Г); средние геометрические значения для KLRG1 у позитивных по мультимеру CD8-Т-клеток (Б и Д) и средние геометрические значения для PD1 у позитивных по мультимеру CD8-Т-клеток (В и Е). А-В: мышей линии C57BL/6 вакцинировали 3 раза в день 0, день 3 и день 7 и кровь брали в день 7 и день 14. Г-Е, мышей линии C57BL/6 вакцинировали 3 раза в день 0, день 7 и день 14 и кровь брали в день 14 и день 21. Вакцинацию осуществляли s.c. с использованием Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль. Окрашивание мультимером осуществляли в образцах крови (один эксперимент, 4 мыши на группу);

на фиг. 29 - полученные в примере 16 данные о секреции IL-6, свидетельствующей об активации APC после инкубации BMDC с различными конструкциями, которые указаны на чертеже. В целом, метод состоял в следующем: BMDC высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 1 мкМ Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa, Z13Mad5, EDAZ13Mad5 или EDAMad5, и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Секрецию IL-6 количественно оценивали в супернатанте с помощью ELISA. Представлены средние \pm СКО для 2-3 отдельных экспериментов;

на фиг. 30 - полученные в примере 16 данные о секреции TNF- α , свидетельствующей об активации APC после инкубации клеток Raw 264.7 с различными конструкциями, указанными на чертеже. В целом, метод состоял в следующем: клетки Raw 264.7 высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 1 мкМ Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa или Z13Mad5, и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Секрецию TNF- α количественно оценивали в супернатанте с помощью ELISA. Представлены средние \pm СКО для 2-3 отдельных экспериментов;

на фиг. 31 - полученные в примере 17 данные о секреции IL-8, свидетельствующей о связывании TLR4 после инкубации клеток HEK-hTLR4 с различными конструкциями, указанными на чертеже. В целом, метод состоял в следующем: клетки HEK-hTLR4 высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 1 мкМ Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa, Z13Mad5, EDAZ13Mad5 или EDAMad5, и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Секрецию IL-8 количественно оценивали в супернатанте с помощью ELISA. Представлены средние \pm СКО для 2 отдельных экспериментов;

на фиг. 32 - полученные в примере 18 данные о количестве метастазов на модели метастазирования легкого с использованием полутерапевтического режима. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.v. 1×10^5 опухолевых клеток меланомы линии B16-OVA и вакцинировали дважды (d0 и d9) путем подкожной инъекции в дозе 2 нмоль EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (доза, эквивалентная EDA) или только MPLA в правую боковую область. Мышей умерщвляли в день 13 и изымали легкие. Количество метастатических очагов подсчитывали в каждом легком. **, $p < 0,01$ (одностронний дисперсионный анализ с критерием Тьюки для множественных сравнений);

на фиг. 33 - полученные в примере 19 данные о количестве метастазов на модели метастазирования легкого с использованием полутерапевтического режима. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.v. 1×10^5 опухолевых клеток меланомы линии B16-OVA и вакцинировали дважды (d0 и d9) путем подкожной инъекции (s.c.) в дозе 0,5 нмоль Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa или Z13Mad5 + Pam3CSK4 (доза, эквивалентная Anaxa) в правую боковую область. Мышей умерщвляли в день 21 и изымали легкие. Количество метастатических очагов подсчитывали в каждом легком. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (непарный t-критерий);

на фиг. 34 - полученные в примере 20 данные количественной оценки SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток на модели глиобластомы Quad-G1261. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.e. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (d7 и 21) путем s.c.-инъекции в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или 2 нмоль Z13Mad5 и 2 нмоль Anaxa. SIINFEKL-специфические CD8-Т-клетки количественно определяли в крови и в BIL (инфильтрующие головной мозг лейкоциты) в d28 путем окрашивания мультимером (5-8 мышей на группу);

на фиг. 35 - полученные в примере 20 данные о секреции цитокинов. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.e. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (d7 и 21) путем s.c.-инъекции в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или 2 нмоль Z13Mad5 и 2 нмоль Anaxa. Выделяли BIL и культивировали в течение 6 ч со зрелыми BMDC, загруженными или не загруженными пептидом S11NFEKL, в присутствии брэфелдина А перед внутриклеточным окрашивани-

ем цитокинов. Данные представлены в виде % CD8-Т-клеток, секретирующих цитокин (5-8 мышей на группу);

на фиг. 36 - полученные в примере 21 данные о воздействии Z13Mad5Anaxa на выживаемость на модели глиобластомы Quad-G1261. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали $i.e.$ 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали трижды (d7, d21 и d35) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль. Мышей ежедневно взвешивали и умерщвляли, когда потеря веса достигала более 15%;

на фиг. 37 - полученные в примере 22 данные о воздействии Z13Mad5Anaxa на рост опухолей и на выживаемость на подкожной модели опухоли EG7-OVA с использованием профилактического режима. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 вакцинировали дважды (d-21 и d-7) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль в правую боковую область, а затем имплантировали в день 0 s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля. (А) Рост опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО); ****, $p < 0,0001$ (2-сторонний дисперсионный анализ в день 30). (Б) Кривая выживаемости для 7 мышей на группу. На графике показаны медианы выживаемости (m.s.). ***, $p < 0,001$ (логранговый критерий);

на фиг. 38 - полученные в примере 23 данные о воздействии Z13Mad5Anaxa на рост опухолей и на выживаемость на подкожной модели опухоли B16-OVA с использованием терапевтического режима на развитых опухолях. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 1×10^5 опухолевых клеток B16-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d14 и d21) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль в правую боковую область. (А) Рост опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО); *, $p < 0,05$ (2-сторонний дисперсионный анализ в день 32). (Б) Кривая выживаемости для 7 мышей на группу. На графике показаны медианы выживаемости (m.s.);

на фиг. 39 - полученные в примере 24 данные о воздействии CPP в составе конструкции Z13Mad5Anaxa на рост опухолей и на выживаемость на подкожной модели опухоли EG7-OVA. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали в день 0 s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область, а затем вакцинировали дважды (d5 и d13) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa или Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля. (А) Рост опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО); ****, $p < 0,0001$. (Б) Кривая выживаемости для 7 мышей на группу. На графике показаны медианы выживаемости (m.s.). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$;

на фиг. 40 - полученные в примере 25 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на иммунный ответ. (А), либо 0,5 нмоль (Б) Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa или Z18Mad5Anaxa. У мышей брали кровь в дни 7 после 2-, 3-, 4- и 5-й вакцинации и осуществляли окрашивание мультимером (один эксперимент, 4 мыши на группу). *, $p < 0,05$ при сравнении вакцинированных и наивных мышей в каждый момент времени за исключением Vac2 для вакцинированных Z18Mad5Anaxa мышей;

на фиг. 41 - полученные в примере 26 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на CD8-Т-клетки в селезенке (А), дренирующие лимфатические узлы (Б) и костный мозг (В). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали пять раз (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 и Wk8) s.c, используя в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa. Через 9 дней после 5-й вакцинации мышей умерщвляли, изымали органы и осуществляли окрашивание мультимером;

на фиг. 42 - полученные в примере 26 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на Т-клетки в селезенке (CD8-Т-клеточный ответ (А) и CD4-Т-клеточный ответ (Б)). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали пять раз (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 и Wk8) s.c, используя в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa. (А) Через 9 дней после 5-й вакцинации осуществляли Elispot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидом SIINF EKL OVACD8. (Б) Через 9 дней после 5-й вакцинации осуществляли Elispot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидом OVACD4;

на фиг. 43 - полученные в примере 26 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на эффекторную функцию Т-клеток. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали пять раз (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 и Wk8) s.c, используя в дозе 2 нмоль Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa. Через 9 дней после 5-й вакцинации осуществляли внутриклеточное окрашивание клеток селезенки, стимулированных пептидом SIINF EKL OVACD8;

на фиг. 44 - полученные в примере 27 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на рост опухолей (А) и на уровни выживаемости (Б). Мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) с помощью s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль в правую боковую область. (А) Рост опухолей у 7 мышей на группу (среднее значение \pm СКО); *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$ (2-сторонний дисперсионный анализ, тестирование в день 28). (Б) Кривая выживаемости для 7 мышей на группу. На графике показаны медианы выживаемости (m.s.). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (логранговый критерий);

на фиг. 45 - полученные в примере 28 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на иммунный ответ. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали три раза (Wk0, Wk2 и Wk4) s.c, используя в дозе 2 нмоль (А) или 0,5 нмоль (Б) EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 или EDAZ18Mad5. У мышей брали

кровь через 7 дней после 3-й вакцинации и осуществляли окрашивание мультимером (один эксперимент, 4 мыши на группу). *, $p < 0,05$;

на фиг. 46 - полученные в примере 29 данные о воздействии EDAZ14Mad5 на рост опухолей (А) и уровни выживаемости (Б). Мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) с помощью s.c.-инъекции EDAZ14Mad5 в дозе 2 нмоль в правую боковую область. Левая панель: рост опухолей у 7 мышей на группу (среднее \pm СКО); **, $p < 0,01$ (2-сторонний дисперсионный анализ, тестирование в день 27). Правая панель: кривая выживаемости для 7 мышей на группу. На графике показаны медианы выживаемости (m.s.);

на фиг. 47 - полученные в примере 30 результаты количественной оценки SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток на модели глиобластомы Quad-G1261. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.e. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (d7 и 21) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль или Z13Mad5 в дозе 2 нмоль и Anaxa в дозе 2 нмоль. SIINFEKL-специфические CD8-Т-клетки количественно определяли в крови и в ВIL в d28 путем окрашивания мультимером (7-16 мышей на группу);

на фиг. 48 - полученные в примере 30 данные о секреции цитокинов. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.e. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (d7 и 21) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль или Z13Mad5 в дозе 2 нмоль и Anaxa в дозе 2 нмоль. ВIL выделяли и культивировали в течение 6 ч с созревшими BMDC, нагруженными или не нагруженными пептидом S11NFEKL, в присутствии брэфелдина А перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов. Данные представлены в виде % CD8-Т-клеток, секретирующих цитокин (7-16 мышей на группу);

на фиг. 49 - полученные в пример 31 данные о воздействии Z13Mad8Anaxa на Т-клетки в селезенке (CD8-Т-клеточный ответ (А) и CD4-Т-клеточный ответ (Б)). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали четыре раза (Wk0, Wk2, Wk4 и Wk6) s.c. с использованием Z13Mad8Anaxa в дозе 2 нмоль. (А) Через одну неделю после 4-й вакцинации осуществляли Elispot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидом gp70CD8. (Б) Через одну неделю после 4-й вакцинации осуществляли Elispot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидом gp70CD4;

на фиг. 50 - полученные в пример 32 данные о воздействии Z13Mad11 Anaxa на количество метастазов на модели метастазов в легком B16 (А) и на Т-клеточный ответ в селезенке (Б). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали два раза (день 0, день 10) s.c. с использованием Z13Mad11 Anaxa в дозе 1 нмоль;

на фиг. 51 - полученные в пример 33 данные о воздействии Z13Mad9Anaxa на Т-клетки в селезенке (CD8-Т-клеточный ответ). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали четыре раза (Wk0, Wk2, Wk4 и Wk6) s.c. с использованием Z13Mad9Anaxa в дозе 2 нмоль. Через одну неделю после 4-й вакцинации осуществляли Elispot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидом adpgk;

на фиг. 52 - полученные в примере 34 данные о воздействии комплексов, имеющих различные CPP, на иммунный ответ. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали два раза (Wk0 и Wk2) s.c. с использованием в дозе 2 нмоль либо Z13Mad5Anaxa, либо TatFMad5Anaxa. У мышей брали кровь через 7 дней после 2-й вакцинации и осуществляли окрашивание мультимером (один эксперимент, 8 мышей на группу);

на фиг. 53 - полученные в пример 35 результаты количественной оценки SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток у наивных мышей. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 вакцинировали однократно (день 0) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль (группа "Z13Mad5Anaxa"), либо Z13Mad5 в дозе 2 нмоль и Anaxa в дозе 2 нмоль (группа "Z13Mad5+Anaxa"). SIINFEKL-специфические CD8-Т-клетки количественно определяли в крови в d7 путем окрашивания мультимером (4-8 мышей на группу);

на фиг. 54 - полученные в примере 36 данные о воздействии Z13Mad12Anaxa на Т-клетки в крови (CD8-Т-клеточный ответ). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2) s.c. с использованием Z13Mad12Anaxa в дозе 2 нмоль. Через 1 неделю после 2-й вакцинации осуществляли окрашивание мультимером в отношении неоантигена geps1 на клетках крови;

на фиг. 55 - полученные в примере 37 данные об экспрессии маркеров активации HLA-DR, CD83, CD80 и CD86 (слева направо), выделенных из моноцитов человеческой крови дендритными клетками (DC) из одной лейкоцитарной пленки. DC стимулировали с использованием в дозе 300 нМ Z13Mad5Anaxa (нижние панели) или Z13Mad5 (верхние панели) в течение 48 ч. Для каждого состояния осуществляли также окрашивание указанного изотипа.

Примеры

Ниже представлены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления и объекты изобретения. Однако объем настоящего изобретения не ограничен указанными в настоящем описании конкретными вариантами осуществления изобретения. Представленные ниже препараты и примеры даны с целью лучшего понимания изобретения специалистами в данной области и воплощения на практике настоящего изобретения. Однако объем настоящего изобретения не ограничен приведенными в качестве примера вариантами осуществления изобретения, которые представлены только с целью

иллюстрации отдельных объектов изобретения, и под объем изобретения подпадают функционально эквивалентные методы. Так, различные модификации изобретения в дополнение к указанным в настоящем описании должны быть очевидны специалистам в данной области из представленного выше описания, прилагаемых чертежей и описанных ниже примеров. Указанные модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Созревание *in vitro* человеческих дендритных клеток.

В основу настоящего исследования была положена задача изучить способность комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, индуцировать созревание дендритных клеток. В настоящем исследовании комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представлял собой слитый белок, содержащий проникающий в клетку пептид "Z13", белок "MAD5", состоящий из различных CD8⁺- и CD4⁺-эпитопов из различных антигенов, и пептидного агониста TLR4 "EDA". Таким образом, создавали слитый белок с EDA-пептидом в N-концевом положении и различными контрольными конъюгированными белками без Z13 или EDA, или без них обоих.

Так, создавали следующие конструкции, в которых аминокислотная последовательность проникающего в клетку пептида "Z13" подчеркнута, а пептидного агониста TLR "EDA" обозначена курсивом.

EDAZ13Mad5.

Последовательность

МНННННННID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY
KNRVASRKSR AKFKQLLOHY REVAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA
АНАЕINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFAFSEA QGALANIAVD
KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

[SEQ ID NO: 26].

Молекулярная масса: 25057 Да.

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, EαCD4 и OVACD8.

Содержит агонист TLR EDA (Lasarte J.J. и др., The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses *in vivo*. J. Immunol., 178(2), 2007, сс. 748-756).

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 1M L-аргинин, pH 8.

Уровень эндотоксинов: < 0,01 эндотоксиновых единиц (EU)/мкг.

Z13Mad5.

Последовательность

МНННННННKRY KNRVASRKSR AKFKQLLOHY REVAAKSSE
NDRLRLLLKE SLKISQAVHA АНАЕINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP
RFAKFAFSEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

[SEQ ID NO: 29].

Молекулярная масса: 15196 Да/

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, EαCD4 и OVACD8.

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 1M L-аргинин, pH 9.

Уровень эндотоксинов:

партия 1: 0,32 EU/мг;

партия 2: 0,44 EU/мг.

Mad5.

Последовательность

МНННННННE SLKISQAVHA АНАЕINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP
RFAKFAFSEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

[SEQ ID NO: 30].

Молекулярная масса: 10154,6 Да.

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, EαCD4 и OVACD8.

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 0,5M L-аргинин, pH 8.

Уровень эндотоксинов: 0,069 EU/мг.

Исследовали белки EDZ13Mad5, Z13Mad5 и Mad5 в отношении их способности индуцировать созревание человеческих дендритных клеток (DC). После инкубации в течение 48 ч с 300 нМ белком оценивали экспрессию маркеров активации (CD86, CD40, CD83 и HLA-DR) на человеческих DC с помощью FACS (фиг. 1-4). В качестве отрицательного контроля использовали специфические для каждого белка

буферы.

Результаты для CD40 представлены на фиг. 1, для CD86 на фиг. 2, для HLA-DR на фиг. 3 и для CD83 на фиг. 4. В то время как EDAZ13Mad5 индуцировал созревание человеческих DC, о чем свидетельствует повышающая регуляция CD86, HLA-DR и CD83, белки Z13Mad5 и Mad5 не обладали способностью активировать человеческие DC. Эти результаты свидетельствуют о том, что EDA-компонент белка ответствен за повышающую регуляцию маркеров активации на человеческих DC.

Пример 2. Презентация эпитопов *in vitro* (ТКГС I).

В основу настоящего исследования была положена задача изучить функциональную ограниченную ГКГС класса I кросс-презентацию в мышинной системе *in vitro* с использованием полученных из костного мозга дендритных клеток (BMDC) и спленоцитов из различных трансгенных по TCR мышей. Для этой цели использовали конструкции EDAZ13Mad5 и Mad5 (описанные выше в примере 1) и конструкцию EDAMad5.

EDAMad5.

Последовательность

MNNNNNNNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTE
SLKISQAVHA ANAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA
QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS

[SEQ ID NO: 31].

Молекулярная масса: 20017 Да.

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, E α CD4 и OVACD8.

Содержит агонист TLR EDA.

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 0,5M L-аргинин, pH 8.

Уровень эндотоксинов: 1,8 EU/мг.

BMDC загружали в течение ночи 300 nM белками EDAMad5, EDAZ13Mad5 и Mad5, содержащими эпитопы OVACD8, OVACD4+ и gp100. Осуществляли мониторинг процессинга и презентации этих ограниченных ГКГС I эпитопов OVACD8+ и gp100, измеряя *in vitro* пролиферацию наивных OVA₂₅₇₋₂₆₄-специфических CD8⁺-Т-клеток из трансгенных по OT-1 Т-клеточному рецептору (TCR) мышей и gp100-специфических CD8⁺-Т-клеток из трансгенных по P-mel Т-клеточному TCR мышей соответственно. Таким образом, осуществляли мониторинг эффективности ограниченной ГКГС класса I презентации эпитопа OVACD8 и эпитопа gp100 через 4 дня с использованием меченных CFSE OT1-клеток и P-Mel-клеток соответственно. Мониторинг процессинга и презентации ограниченного ГКГС II эпитопа OVACD4⁺ осуществляли путем измерения *in vitro* пролиферации наивных OVA₃₂₃₋₃₃₉-специфических CD4⁺-Т-клеток из трансгенных по OT-2 Т-клеточному рецептору (TCR) мышей. Таким образом, осуществляли мониторинг эффективности ограниченной ГКГС класса II презентации эпитопа OVACD4 через 4 дня с использованием меченных CFSE OT2-клеток. В качестве контроля BMDC подвергали в течение 1 ч обработке в импульсном режиме пептидом в дозе 5 мкМ (один эксперимент, репрезентативный для 2 отдельных экспериментов).

Результаты представлены на фиг. 5. Обнаружены сходные кросс-презентация и способность к процессингу всех изученных белков на основе Mad5.

Пример 3. CD8-Т-клеточный иммунный ответ.

Для изучения эффективности конъюгированных с EDA белков в отношении индукции CD8⁺-Т-клеточного ответа мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2) путем подкожной инъекции конструкций EDAZ13Mad5 или EDAMad5 (описанных в примерах 1 и 2) в дозе либо 2 нмоль, либо 10 нмоль. Применяемую в качестве положительного контроля группу вакцинировали Mad5 и агонистом TLR4 MPLA (в дозе, эквивалентной EDA). Изучали две дозы конструкций (2 нмоль) (фиг. 6) и (10 нмоль) (фиг. 7). В каждой группе использовали 3-4 мыши.

Через 7 дней после последней вакцинации у мышей брали кровь и осуществляли окрашивание пентамером для мониторинга OVA-специфического иммунного ответа в крови. На фиг. 8 представлен процент позитивных по пентамеру CD8⁺-Т-клеток во всех группах и для обеих тестируемых доз.

Эти данные свидетельствуют о том, что указанный иммунный ответ оказался ниже при дозе 10 нмоль, чем при дозе 2 нмоль. При использовании обеих доз, 2 и 10 нмоль, опосредуемый вакциной иммунный ответ оказался более стойким в группе, обработанной EDAZ13Mad5, чем в группе, обработанной EDAMad5. Кроме того, обнаружен повышенный иммунный ответ, когда агонист TLR4 конъюгировали с вакциной.

Пример 4. Эффективность вакцины в отношении роста опухоли на стандартной модели опухоли EG.7-OVA.

Для оценки воздействия содержащих EDA конструкций белков на контроль роста опухоли была

выбрана s.c.-модель клеток тимомы EG.7-OVA. Мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область. После имплантации опухолей мышам вакцинировали в дни 5 и 13, используя в дозе 10 нмоль одну из следующих конструкций (описание конструкций см. в примерах 1 и 2): EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 или Mad5 и MPLA (в дозе, эквимольной EDA) s.c. в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля.

На фиг. 9 представлены данные о росте опухолей у 7 мышей на группу (среднее значение \pm СКО); *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 относительно контрольной группы (2-сторонний дисперсионный анализ). На фиг. 10 представлены кривые роста индивидуальных опухолей (для каждой из 7 мышей на группу). На фиг. 11А представлена кривая выживаемости 7 мышей на группу; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 относительно контрольной группы (логранговый критерий). На фиг. 11Б представлена кривая периода без развития опухоли для 7 мышей на группу; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 относительно контрольной группы (логранговый критерий).

Результаты продемонстрировали, что при использовании в терапевтическом режиме конструкция EDAZ13Mad5 представляла собой единственную белковую вакцину, которая значительно контролировала рост опухолей по сравнению с контрольной группой, что приводило к существенному улучшению кривых периода без развития опухоли и кривых выживаемости.

Таким образом, результаты позволяют предположить, что конструкция белка EDAZ13Mad5 представляет собой высокоэффективную вакцину для контроля роста опухолей при применении в терапевтическом режиме.

Пример 5. Эффективность вакцины в отношении роста опухолей на модели метастатической меланомы.

Для оценки эффективности на модели метастазов в легкие с использованием опухолевых клеток B16-OVA в полутерапевтическом режиме применяли различные конструкции белков: EDAMad5, EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (см. в примерах 1 и 2 описание конструкций) и индивидуально MPLA. Мышам линии C57BL/6 имплантировали i.v. 1×10^5 опухолевых клеток меланомы B16-OVA и одновременно (d0) вводили путем подкожной инъекции в правую боковую область в дозе 2 нмоль вакцину (EDAMad5, EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA, MPLA индивидуально). Через 9 дней мышам вакцинировали второй раз такой же дозой. Дополнительно контрольные группы вакцинировали с использованием в дозе 2 нмоль Z13Mad5 и агониста TLR4 MPLA (в дозе, эквимольной EDA) или только MPLA. Мышей умерщвляли в день 13 и изымали легкие. В каждом легком подсчитывали количество метастатических очагов. Результаты представлены на фиг. 12.

Результаты продемонстрировали, что конъюгат EDAZ13Mad5 обладал такой же эффективностью, что и Z13Mad5 + MPLA в отношении ингибирования метастазов опухоли в легкое. Кроме того, установлено, что EDA-Mad5 обладал более низкой эффективностью, чем EDAZ13Mad5, что свидетельствует о имеющей решающее значение роли Z13 в эффективности вакцины.

Пример 6. Эффективность вакцины в отношении роста опухолей на модели метастатической меланомы - профилактический режим.

Кроме того, эффективность различных конструкций белков EDAMad5, EDAZ13Mad5 и Z13Mad5 + MPLA (см. в примерах 1 и 2 описание конструкций) оценивали на модели метастазов в легкие в профилактическом режиме. Мышей линии C57BL/6 вакцинировали за 21 и 7 дней до имплантации опухолевых клеток (d-21 и d-7) путем подкожной инъекции (s.c.) в дозе 2 нмоль EDAZ13Mad5, EDAMad5 или Z13Mad5 + MPLA (в дозе, эквимольной EDA) в правую боковую область. В день 0 мышам имплантировали i.v. 1×10^5 опухолевых клеток меланомы B16-OVA. Мышей умерщвляли в день 14 и изымали легкие. Результаты представлены на фиг. 13.

Пример 7. Создание дополнительных конструкций, содержащих пептидный агонист TLR2.

В этом случае комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, представлял собой слитый белок, который содержал проникающий в клетку пептид "Z13", белок "MAD5", состоящий из различных CD8⁺- и CD4⁺-эпитопов различных антигенов, и пептидный агонист TLR2 "Анаха". Таким образом, создавали слитые белки с пептидом Анаха в С-концевом или N-концевом положении.

Так, создавали следующие конструкции, в которых аминокислотная последовательность проникающего в клетку пептида "Z13" подчеркнута, а пептидного агониста TLR "Анаха" обозначена курсивом. АнахаZ13Mad5.

Последовательность

MNNHHHHSTV *HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVA*
 SRKSRAKFKQ LLQHYREVAA AKSENDRRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI
 NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRFAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD
 VEQLESIINF EKLTEWTGS

[SEQ ID NO: 27].

Молекулярная масса: 18973 Да.

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, EαCD4 и OVACD8.

Содержит 35-мерный пептид аннексина.

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 0,5M L-аргинин, pH 8.

Уровень эндотоксинов: 5,17 EU/мг. Z13Mad5 Anaxa.

Последовательность

MNNNNHHKRYKNRVA SRKSRAKFKQ LLOHYREVAA AKSENDRLR

LLLKESLKIS QAVHAANAIEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRFAKF

ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS

LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

[SEQ ID NO: 28].

Молекулярная масса: 18973 Да.

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, EαCD4 и OVACD8.

Содержит 35-мерный пептид аннексина.

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 0,5M L-аргинин, pH 8.

Уровень эндотоксинов: 3,1 EU/мг.

Пример 8. Оценка TLR2-связывания (клеточные линии HEK-hTLR2).

В основу настоящего исследования была положена задача оценить, могут ли конструкции белков Z13Mad5Anaxa и AnaxaZ13Mad5 (см. в примере 7 описание конструкций этих белков) связываться с TLR2 в качестве агониста. Клетки HEK-Blue™ hTLR2 высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 0,3, 1 или 3 мкМ AnaxaZ13Mad5 или Z13Mad5Anaxa, и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. В качестве положительного контроля использовали Pam3CSK4, агонист TLR2, в концентрации 500 нг/мл.

Для мониторинга активации NF-κB/API добавляли 20 мкл супернатанта в среду для детекции QuantiBlue® и инкубировали при 37°C за 1 ч до определения ОП (620 нм). Результаты представлены на фиг. 14А.

Секрецию IL-8 в супернатанте количественно оценивали с помощью ELISA. Результаты представлены на фиг. 14Б.

Результаты (фиг. 14А,Б) свидетельствуют о том, что Z13Mad5Anaxa и AnaxaZ13Mad5 обладали одинаковой способностью связываться с TLR2 в зависимости от дозы.

Пример 9. Индукция *in vivo* специфических CD8⁺-Т-клеток.

Для изучения эффективности конъюгированных с Anaxa белков, описанных в примере 7, в отношении индукции CD8⁺-Т-клеточных ответов мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (Wk0 и Wk2) путем подкожной инъекции AnaxaZ13Mad5 в дозе 2 нмоль или Z13Mad5 Anaxa в дозе 2 нмоль. Через 7 дней после последней вакцинации у мышей брали кровь, и для мониторинга OVA-специфического иммунного ответа в крови осуществляли окрашивание пентамером (один эксперимент с 4 мышами на группу). Результаты представлены на фиг. 15 и 16.

Эти данные свидетельствуют о том, что и вакцина Z13Mad5Anaxa, и конструкция AnaxaZ13Mad5 вызывали сильный иммунный ответ.

Пример 10. Терапевтическое воздействие на рост опухолей.

Для оценки воздействия конъюгированных с Anaxa конструкций белков, описанных в примере 7, на контроль роста опухолей применяли стандартную модель опухоли, а именно, созданную путем *s.c.*-имплантации клеток тимомы EG.7-OVA.

Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область. После имплантации опухолей каждую из трех групп по 7 мышей в каждой вакцинировали *s.c.* в правую боковую область в дни 5 и 13 путем подкожной инъекции в дозе 10 нмоль либо AnaxZ13Mad5 (группа 1), либо Z13Mad5Anaxa (группа 2), либо Z13Mad5 и Pam3CSK4 (в дозе, эквивалентной Anaxa; группа 3). Для сравнения воздействия белка, смешанного с другим адьювантом, контрольную группу вакцинировали Z13Mad5 и Pam3CSK4 (в дозе, эквивалентной Anaxa). Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля. Результаты представлены на фиг. 17-19.

При применении в терапевтическом режиме белковые вакцины Z13Mad5 Anaxa и AnaxaZ13Mad5 обладали более высокой эффективностью в отношении контроля роста опухолей по сравнению с контрольной группой, т.е. совместная инъекция Z13Mad5 и Pam3CSK4 обеспечивала существенно улучшенную кривую выживаемости. В частности, для Z13Mad5 Anaxa и AnaxaZ13Mad5 была продемонстрирована существенно более высокая эффективность, чем для Z13Mad5 при введении отдельно от Pam3CSK4. Таким образом, результаты позволяют предположить, что конструкции белков Z13Mad5Anaxa и AnaxaZ13Mad5 являются многообещающими конъюгированными вакцинами для контроля роста опухо-

лей при использовании в терапевтическом режиме.

Пример 11. Терапевтическое воздействие на рост опухолей - сравнение конструкций, содержащих различные агонисты TLR.

Задачей настоящего исследования было сравнение эффективности различных конструкций белковых вакцин, конъюгированных с различными агонистами TLR, а именно: EDAZ13Mad5 и Z13Mad5Anaxa, которые описаны в примерах 1 и 7, в отношении контроля роста опухолей. Для этой цели мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 клеток тимомы EG.7-OVA в левую боковую область согласно методу, описанному в примере 10. Мышей (каждую из 7 мышей в группе) вакцинировали *s.c.* в правую боковую область в дни 5 и 13, используя в дозе 2 нмоль либо EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, либо используя совместную инъекцию Z13Mad5+MPLA (в дозе, эквивалентной EDA).

Результаты представлены на фиг. 20, 21 и 22. В этой экспериментальной схеме Z13Mad5Anaxa, EDAZ13Mad5 и Z13Mad5+MPLA обладали сходной способностью обеспечивать существенный контроль роста опухолей. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что Z13Mad5Anaxa является наиболее эффективной конструкцией в отношении уровня контроля роста опухолей, а эффективность EDAZ13Mad5 несколько превышала эффективность Z13Mad5+MPLA при изучении с использованием указанной экспериментальной схемы.

Пример 12. Зависимость эффекта от дозы Z13Mad5Anaxa в отношении контроля роста опухолей.

Для определения оптимальной дозы содержащей конъюгат вакцины оценивали способность Z13Mad5Anaxa (см. пример 7) в трех различных дозах (0,5, 2 и 10 нмоль) контролировать рост опухолей. Дозовую зависимость конструкции Z13Mad5Anaxa оценивали на *s.c.*-модели, созданной с использованием клеток тимомы EG.7-OVA, согласно методу, описанному выше в примере 10. После имплантации опухолей мышей вакцинировали дважды (в день 5 и в день 13 после имплантации опухолей) в терапевтическом режиме с использованием Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5, 2 или 10 нмоль.

Мышам линии C57BL/6 имплантировали *s.c.* 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d5 и d13) путем подкожной инъекции в дозе либо 0,5, либо 2, либо 10 нмоль Z13Mad5Anaxa в правую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля.

Данные о росте опухолей в группе из 7 мышей представлены на фиг. 23. Эти данные свидетельствуют о том, что дозы 0,5 и 2 нмоль обладали по меньшей мере такой же эффективностью, что и доза 10 нмоль в отношении контроля роста опухолей.

Пример 13. Влияние различных путей введения Z13Mad5Anaxa.

Это исследование базировалось на полученных в описанных выше примерах результатах, продемонстрировавших эффективность содержащей конъюгат вакцины Z13Mad5Anaxa (см. пример 7), которая обладала способностью вызывать специфические иммунные ответы и оказалась эффективной в отношении контроля роста опухолей на описанной выше подкожной модели опухоли EG7.

Для изучения воздействия подкожного, внутримышечного и внутрикожного путей введения сравнивали иммунные ответы, вызываемые подкожной, внутримышечной и внутрикожной инъекциями. Внутрикожные инъекции осуществляли, используя устройство PLEASE фирма Pantec Biosolutions.

Мышей вакцинировали три раза каждые две недели (Wk0, Wk2 и Wk4), используя Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 или 2 нмоль (см. пример 7). Для того чтобы оказывать целенаправленное воздействие на несколько лимфатических узлов, 1- и 3-ю вакцинации осуществляли в правую боковую область, а 2-ю осуществляли в левую боковую область. Ответ SIINFEKL-специфических CD8⁺-Т-клеток анализировали через 1 неделю после 2- и 3-й вакцинаций в крови. На фиг. 24 представлены данные об ответах SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток после каждой вакцинации, обнаруженные в крови мышей линии C57BL/6, вакцинированных три раза (Wk0, Wk2 и Wk4) *s.c.*, *i.d.* или *i.m.* с использованием 0,5 нмоль (фиг. 24 А) или 2 нмоль (фиг. 24 Б) Z13Mad5Anaxa. Кровь брали у мышей через 7 дней после 2- и 3-й вакцинаций и осуществляли окрашивание мультимером (один эксперимент с 4 мышами на группу).

Результаты продемонстрировали, что при использовании двух изученных доз (0,5 и 2 нмоль) (I) введение всеми изученными путями приводило к SIINFEKL-специфическому CD8-Т-клеточному иммунному ответу и (II) подкожная вакцинация приводила к самому сильному SIINFEKL-специфическому CD8-Т-клеточному иммунному ответу. При подкожном введении максимальный ответ достигался после 3-й вакцинации и все еще поддерживался после 3-й вакцинации. SIINFEKL-специфический CD8-Т-клеточный иммунный ответ после 2-й вакцинации, вызываемый при внутрикожной и внутримышечной вакцинациях, был ниже, чем при подкожной вакцинации, и не повышался после 3-й вакцинации.

Далее оценивали эффекторную функцию и статус истощения SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток, анализируя KLRG1 (представитель 1 лектинподобного рецептора клеток-киллеров подсемейства G1) и PD-1 соответственно.

Для этой цели мышей линии C57BL/6 вакцинировали три раза (Wk0, Wk2 и Wk4) *s.c.*, *i.d.* или *i.m.* Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль (см. пример 7). Кровь брали у мышей через 7 дней после 2- и 3-й вакцинаций и осуществляли FACS-окрашивание. Экспрессию KLRG1 и PD-1 анализировали по позитивным по мультимеру CD8-Т-клеткам (один эксперимент с 4 мышами на группу). Результаты представлены на фиг. 25.

Указанные данные свидетельствуют о том, что экспрессия KLRG1 сильно повышалась на SIIN-

FEKL-специфических CD8-T-клетках после подкожной вакцинации. После i.d.- или i.m.-вакцинации обнаруженное действие оказалось более низким. Процент KLRG 1-позитивных клеток среди SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток также повышался после s.c.-вакцинации (данные не представлены).

В противоположность KLRG 1 экспрессия PD-1 снижалась с течением времени и с количеством вакцинаций при подкожном и внутримышечном путях вакцинации. Это позволяет предположить, что истощение SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток не происходило. Процент PD1-позитивных клеток среди SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток также снижался после s.c.- и i.m.-вакцинаций (данные не представлены). Важно отметить, что экспрессия PD-1 оказалась выше после 2-й вакцинации, когда мышью вакцинировали подкожно, что отражает статус более ранней активации специфических T-клеток (Keir M.E. и др., PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 26, 2008, сс. 677-704).

Анализировали также маркер позднего истощения Tim-3. Во всех группах обнаружен очень низкий уровень его экспрессии.

В совокупности, результаты свидетельствуют о том, что подкожная вакцинация вызывает наиболее сильный специфический CD8-T-клеточный иммунный ответ по сравнению с внутримышечными или внутрикожными инъекциями.

Пример 14. Внутринодальный путь введения.

С учетом результатов предыдущих экспериментов (пример 13) проводили дополнительное изучение внутринодального пути введения. Для этого исследовали иммунный ответ, вызываемый внутринодальной инъекцией Z13Mad5Anaxa (см. пример 7).

Для этой цели мышам сначала инъецировали подкожно голубой Эванса, позволяющий легко визуализировать лимфатические узлы, в которые осуществляли инъекции, и осуществлять внутринодальную инъекцию без инвазивной хирургии, например, согласно методу, описанному у Jewell C.M., S.C. Lopez и D.J. Irvine, *In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection adjuvant-releasing polymer particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(38), 2011, сс. 15745-15750.

Мышей линии C57BL/6 вакцинировали два раза каждые две недели (Wk0 и Wk2) внутринодально, используя в дозе 0,5 нмоль Z13Mad5Anaxa (см. пример 7). Первую вакцинацию осуществляли в правый паховый лимфатический узел, а вторую вакцинацию осуществляли в левый паховый лимфатический узел. Кровь брали у мышей через 7 дней после 2-й вакцинации и осуществляли окрашивание мультимером (3 мыши на группу). Другими словами анализировали SIINFEKL-специфический ответ CD8⁺-T-клеток в крови через 1 неделю после 2-й вакцинации. На фиг. 26 показаны SIINFEKL-специфические ответы CD8-T-клеток. Указанные данные свидетельствуют о том, что внутринодальная инъекция также может вызывать ответ SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток.

Пример 15. Схема вакцинации.

Работу по изучению схемы вакцинации начинали с выявления влияния третьей вакцинации при применении описанной выше конструкции Z13Mad5Anaxa (см. пример 7). С учетом предыдущих результатов был выбран подкожный путь введения.

В этом эксперименте первые две вакцинации осуществляли в wk0 и wk2, а 3-ю вакцинацию осуществляли либо в wk4 (фиг. 27 А), либо в wk8 (фиг. 27Б). Таким образом, мышью линии C57BL/6 вакцинировали три раза (фиг. 27 А и В: Wk0, Wk2 и Wk4 и фиг. 27 Б и Г: Wk0, Wk2 и Wk8) s.c, используя Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль. Брали кровь у мышей через 7 дней после последней вакцинации и осуществляли окрашиванием пентамером (один эксперимент с 4 мышам на группу). Соответственно анализировали SIINFEKL-специфический CD8⁺-T-клеточный ответ через 1 неделю после 2- и 3-й вакцинаций (фиг. 27 А и Б). Дополнительно оценивали эффекторную функцию SIINFEKL-специфических T-клеток, анализируя экспрессию KLRG 1 на специфических CD8-T-клетках (фиг. 27 В и Г).

Данные свидетельствуют о том, что по сравнению с контролем процент SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток существенно повышался во все изученные моменты времени (Vac2 и Vac3), а также при использовании обеих схем вакцинации (фиг. 27 А и Б).

Важно отметить, что третья вакцинация в Wk4 обеспечивала наиболее значительное повышение процента SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток (фиг. 27А). Для этих же клеток продемонстрировано повышение эффекторной функции благодаря более высокому уровню экспрессии KLRG 1 (фиг. 27 В). В противоположность этому при осуществлении третьей вакцинации в Wk8 не обнаружено улучшения после третьей вакцинации относительно второй вакцинации касательно SIINFEKL-специфического иммунного ответа и экспрессии KLRG 1.

В совокупности, эти результаты свидетельствуют о том, что CD8-T-клеточный иммунный ответ можно повышать путем укорачивания промежутка времени между второй и третьей вакцинацией.

С учетом того, что более ранняя третья вакцинация, вероятно, усиливала иммунный ответ, в следующем опыте исследовали две короткие схемы вакцинации:

I) три вакцинации в день 0, день 3 и день 7 и

II) три вакцинации в день 0, день 7 и день 14.

И в этом случае также использовали мышью линии C57BL/6 и вакцинацию осуществляли s.c. с применением Z13Mad5Anaxa в дозе 0,5 нмоль (см. пример 7). Осуществляли окрашивание мультимером образцов крови, полученных через 1 неделю после 2- и 3-й вакцинаций (один эксперимент с 4 мышами на

группу).

Таким образом, анализировали SIINFEKL-специфический CD8⁺-Т-клеточный ответ через 1 неделю после 2- и 3-й вакцинаций (фиг. 28А и Г).

Кроме того, оценивали эффекторную функцию SIINFEKL-специфических Т-клеток, анализируя экспрессию KLRG 1 на специфических CD8-Т-клетках (фиг. 28Б и 28Д), и статус истощения путем анализа экспрессии PD-1 специфическими Т-клетками (фиг. 28В и 28Е).

Данные свидетельствуют о том, что аналогично результатам, полученным в первом опыте, вне зависимости от описанной выше схемы вакцинации по сравнению с контролем процент SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток увеличивался во все изученные моменты времени (Vac2 и Vac3), а также в обеих схемах вакцинации (фиг. 28 А и Б).

Однако по сравнению со схемой wk0-wk2-wk4 схема с вакцинациями в день 0, день 3 и день 7 не вызывала столь же сильный SIINFEKL-специфический CD8-Т-клеточный иммунный ответ. Касательно схемы с вакцинациями в день 0, день 7 и день 14, вызываемый SIINFEKL-специфический CD8-Т-клеточный иммунный ответ оказался более сильным по сравнению с описанной ранее схемой (d0-d3-d7), но он не поддерживался после 3-й вакцинации.

В совокупности, результаты, полученные при применении указанных схем вакцинации, свидетельствуют о том, что схема вакцинации wk0-Wk2-Wk4 представляет собой самую лучшую схему вакцинации для вызывания эффективного OVA-специфического CD8-Т-клеточного иммунного ответа с высокой эффекторной функцией.

Пример 16. Способность конъюгированных конструкций агонист TLR-CPP активировать мышинные антигенпрезентирующие клетки (APC).

Для изучения воздействия как компонента, представляющего собой CPP, так и компонента, представляющего собой агонист TLR, в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, вновь применяли описанные выше слитые белки (см. примеры 1, 2 и 7).

Кроме того, создавали дополнительный "контрольный пептид", который также представлял собой слитый белок и который содержал белок "MAD5", состоящий из различных CD8⁺- и CD4⁺-эпитопов из различных антигенов, и пептидный агонист TLR2 "Анаха" (т.е. без проникающего в клетку пептида). Таким образом, дополнительно создавали следующие контрольные конструкции.

Mad5Anaha.

Последовательность

MNNHHNHESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF

AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWEWT GSSTVHEILC

KLSLEGDHST PPSAYGSVKP YTNFDAE

[SEQ ID NO: 32].

Молекулярная масса: 13933 Да.

Характеристики.

Карго-молекула Mad5 содержит эпитопы OVACD4, gp100CD8, EαCD4 и OVACD8.

Содержит 35-мерный пептид аннексина в С-концевом положении.

Буфер для хранения: 50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ, 0,5M L-аргинин, pH 8.

Уровень эндотоксинов: партия 1 - 12,15 EU/мг.

В основу этого исследования была положена задача оценить способность двух взятых в качестве примера комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, а именно: EDАЗ13Mad5 (см. пример 1) и Z13Mad5Anaha (см. пример 7), повышать активацию антигенпрезентирующих клеток по сравнению с референс-комплексами, в которых отсутствовал либо компонент, представляющий собой проникающий в клетку пептид Z13 (Mad5Anaha, см. выше; EDAMad5, см. пример 2), либо агонист TLR (Z13Mad5, см. пример 1).

Для этой цели оценивали способность указанных выше конструкций повышать активацию антигенпрезентирующих клеток (APC) на дендритных клетках из костного мозга (BMDC), которые экспрессируют все TLR за исключением TLR7.

BMDC высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 1 мкМ либо Z13Mad5Anaha (см. пример 7), Mad5Anaha (см. выше), Z13Mad5 (см. пример 1), EDАЗ13Mad5 (см. пример 1), либо EDAMad5 (см. пример 2), и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Активацию APC изучали, осуществляя мониторинг секреции IL-6 в супернатант культуры BMDC. Секрецию IL-6 количественно оценивали в супернатанте с помощью ELISA.

Результаты представлены на фиг. 29. Эти данные четко демонстрируют, что конструкция Z13Mad5Anaha обладала способностью активировать BMDC, однако не обнаружено никакой активации, когда клетки культивировали в присутствии Z13Mad5 или Mad5Anaha. Это позволяет предположить, что не только агонист TLR (Анаха или EDA) имеет решающее значение для активации макрофагов и дендритных клеток, но необходим также и CPP. Кроме того, установлено, что присутствие CPP без агониста

TLR не достаточно, таким образом, фактически оба, и CPP, и агонист TLR имеют решающее значение для активации макрофагов и дендритных клеток.

Указанные результаты подтверждали с использованием другой клеточной линии, такой как клеточная линия мышинных макрофагов Raw 264.7, которая экспрессирует все TLR за исключением TLR5 (Arplequist S.E., R.P. Wallin и H.G. Ljunggren, Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int. Immunol.*, 14(9), 2002, сс. 1065-1074).

Клетки линии Raw 264.7 высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 1 мкМ либо Z13Mad5Anaxa (см. пример 7), Mad5Anaxa (см. выше), либо Z13Mad5 (см. пример 1), и инкубировали в течение 24 ч при 37°C.

Активацию APC в клетках линии Raw 264.7 изучали, осуществляя мониторинг секреции TNF- α в супернатанте культуры Raw 264.7. Секрецию TNF- α количественно оценивали с помощью ELISA в супернатанте. Результаты представлены на фиг. 30.

Считается, что CPP может облегчать проникновение молекулы в клетки, что обеспечивает улучшенный таргетинг внутриклеточного TLR.

В совокупности, данные подтвердили решающее значение как CPP, так и агониста TLR в конъюгированных конструкциях в отношении активации APC. Это действие может быть результатом облегчения проникновения конструкции в клетку, что приводит к оптимальному таргетингу внутриклеточного TLR.

Пример 17. Способность конъюгированных конструкций связываться с человеческим TLR4.

В настоящее время установлено, что пептид Anaxa обладает адьювантной активностью благодаря передаче сигналов через TLR2 (WO 2012/048190 A1), в то время как пептид EDA является встречающимся в естественных условиях лигандом для TLR4 (Okamura Y. и др., The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, 276(13), 2001, сс. 10229-10233).

Кроме того, как продемонстрировано выше в примере 8 и на фиг. 14, комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который содержит пептид Anaxa в качестве агониста TLR, например Z13Mad5Anaxa, обладает способностью связываться с человеческим TLR2 и усиливать секрецию IL-8 клетками линии HEK-hTLR2 (см. пример 8, фиг. 14).

При создании настоящего изобретения оценивали способность комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые содержали либо пептид Anaxa, в качестве агониста TLR, либо пептид EDA в качестве агониста TLR, связываться с человеческим TLR4. Для этой цели HEK-клетки, трансфектированные человеческим TLR4 (HEK-hTLR4), высевали в плоскодонный 96-луночный планшет в культуральную среду, стимулированную 1 мкМ либо Z13Mad5 Anaxa (см. пример 7), Mad5 Anaxa (см. выше), Z13Mad5 (см. пример 1), EDAZ13Mad5 (см. пример 1), либо EDAMad5 (см. пример 2), и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Секрецию IL-8 в супернатанте количественно оценивали с помощью ELISA.

Результаты представлены на фиг. 31. Как и ожидалось, инкубация HEK-hTLR4 с EDAZ13Mad5 приводила к выраженной секреции IL-8, что свидетельствует о связывании EDAZ13Mad5 с TLR4. В соответствии с результатами, полученными в примере 16, секреция IL-8 при использовании EDAMad5 (без CPP) оказалась существенно ниже по сравнению с EDAZ13Mad5, что демонстрирует эффект присутствия CPP. Установлено, что конструкция Z13Mad5, в которой отсутствует агонист TLR, не вызвала секрецию IL-8, свидетельствуя - как и ожидалось - об отсутствии связывания с TLR4.

Важно отметить, что инкубация HEK-hTLR4 с конструкцией Z13Mad5Anaxa приводила к наиболее выраженной секреции IL-8, свидетельствующей о связывании Z13Mad5Anaxa с TLR4. Это является неожиданным, поскольку согласно существовавшей ранее гипотезе Anaxa является агонистом TLR2. И в этом случае аналогичная конструкция, но без CPP (Mad5Anaxa) приводила к существенно более низкой секреции IL-8, что подтверждает результаты, полученные в примере 16.

В совокупности, эти данные (I) подтверждают результаты, полученные в примере 16, (II) подтверждают, что EDA действительно является агонистом TLR4, и (III) и свидетельствуют, что является неожиданным, о том, что пептид Anaxa также является агонистом TLR4 (в дополнение к тому, что он является агонистом TLR2, см. пример 8 и фиг. 14).

Пример 18. Эффективность вакцины в отношении роста опухоли на модели метастазов легкого - полутерапевтический режим: в качестве агониста TLR EDA.

Это исследование базировалось на результатах, полученных в примере 6, демонстрирующих эффективность комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, такого как EDAZ13Mad5, при изучении на модели метастазов меланомы в легкое в профилактическом режиме (см. фиг. 13).

В настоящем исследовании использовали такую же модель метастазов в легкое, а также конструкции белков EDAZ13Mad5 и Z13Mad5 + MPLA (см. в примерах 1 и 2 описание конструкций). Однако при использовании полутерапевтического режима мышей линии C57BL/6 вакцинировали одновременно с имплантацией опухолевых клеток (d0) и второй раз через 9 дней после имплантации (d9). Вакцинацию осуществляли путем подкожной инъекции (s.c.) в дозе 2 нмоль EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (в дозе, эквивалентной EDA) или MPLA в правую боковую область. В день 0 мышам имплантировали i.v. 1×10^5 опухолевых клеток меланомы B16-OVA и вакцинировали дважды (d0 и d9) путем подкожной инъекции (s.c.) в дозе 2 нмоль EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (в дозе, эквивалентной EDA) или MPLA индивиду-

ально в правую боковую область. Мышей умерщвляли в день 13 и легкое изымали. Результаты представлены на фиг. 32.

Результаты продемонстрировали, что конструкция EDAZ13Mad5 оказалась несколько более эффективной, чем Z13Mad5 + MPLA в отношении ингибирования роста метастазов меланомы. Кроме того, никакого адьювантного действия не выявлено при инъекции мышам только MPLA.

Как EDAZ13Mad5, так и Z13Mad5 + MPLA существенно ингибировали метастазы меланомы в легкое при их применении и в профилактическом, и в полутерапевтическом режимах.

Пример 19. Эффективность вакцины в отношении роста опухолей на модели метастазов в легкое - полутерапевтический режим: в качестве агониста TLR Анаха.

Это исследование базировалось на результатах, полученных в примере 18, в нем использовали такую же модель (в полутерапевтическом режиме) и схему эксперимента. Однако изучали воздействие комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые содержали пептид "Анаха" в качестве агониста TLR - вместо агониста TLR EDA, который применяли в примере 18.

Для этой цели мышам линии C57BL/6 имплантировали *i.v.* 1×10^5 опухолевых клеток меланомы B16-OVA и вакцинировали дважды (d0 и d9) путем подкожной инъекции (s.c.) в дозе 0,5 нмоль Z13Mad5Анаха, Mad5Анаха или Z13Mad5 + Pam3CSK4 (в дозе, эквивалентной Анаха) в правую боковую область. Мышей умерщвляли в день 21 и легкое изымали. Количество метастатических очагов подсчитывали в каждом легком. Результаты представлены на фиг. 33.

Результаты продемонстрировали, что конструкция Z13Mad5Анаха оказалась значительно более эффективной, чем Z13Mad5 + Pam3CSK4 в отношении ингибирования роста метастазов меланомы. В противоположность этому, Mad5Анаха не обладала способностью контролировать рост метастазов в легкое, что вновь подтверждает важность CPP.

В целом, эксперимент, проведенный на модели метастазов B16-OVA в легкое, продемонстрировал, что конструкция Z13Mad5Анаха обладала высокой эффективностью в отношении ингибирования роста метастазов меланомы в легкое.

Пример 20. Эффективность вакцины на модели глиобластомы.

В этом исследовании использовали другую модель рака, а именно: модель глиобластомы. Глиома представляет собой наиболее часто встречающуюся форму первичной опухоли головного мозга у взрослых, при этом мультиформная глиобlastома (GBM) является наиболее летальной. Эта опухоль является печально известной с позиции ее высокой инвазивности и агрессивного поведения. В настоящее время наилучшим путем лечения GBM является режим, включающий комбинацию хирургии, химиотерапии и лучевой терапии, который обеспечивает медианный период выживаемости, составляющий только 14,6 месяца. Существует неотложная неудовлетворенная к настоящему времени потребность в новых путях лечения, улучшающих прогноз для страдающих глиомой пациентов. Опосредуемая Т-клетками иммунотерапия умозрительно представляет собой привлекательный вариант лечения при применении в сочетании с существующими путями лечения глиомы, в частности, высоко инвазивной GBM.

Глиома G1261 представляет собой индуцируемую карциногеном модель мышинной глиомы. Эта модель представляет собой одну из очень небольшого количества моделей опухолей головного мозга, созданную на животных с нарушенным иммунитетом, которая имеет характеристики роста, сходные с человеческой GBM (Newcomb E. и D. Zagzag, The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments, в: CNS Cancer Models, Markers, Prognostic, Factors, Targets, and Therapeutic Approaches под ред. E.G. Van Meir, изд-во Humana Press: Atlanta, 2009, сс. 227-241; Jacobs V.L. и др., Current review of *in vivo* GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. ASN Neuro, 3(3): 2011, e00063). Небольшие количества трансплантированных внутрь черепа клеток G1261 образуют внутрочерепные опухоли у мышей линии C57BL/6 (Zhu X. и др., Poly-/CLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN-alpha and IFN-gamma dependent manners, Cancer Immunol Immunother, 59(9), 2010, сс. 1401-1409; Zhu X. и др., Toll like receptor-3 ligand poly-/CLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models. J Transl. Med., 5, 2007, с 10). Клетки обладают умеренной иммуногенностью: они обладают способностью вызывать опухолеспецифический иммунный ответ в области опухоли. Однако опухолеспецифическое иммунные клетки не обеспечивают полный клиренс опухоли.

В настоящее время M. Ollin создал новую модель G1261 (Ohlfest J.R., и др., Vaccine injection site matters: qualitative and quantitative defects in CDB T cells primed as a function of proximity to the tumor in a murine glioma model. J. Immunol., 190(2), 2013, сс. 613-620) путем трансфекции клеток линии G1261 "Quad кассетой" ("четверной кассетой"), экспрессирующей четыре пептида, презентруемых молекулами H-2b класса I или II: человеческий gp100₂₅₋₃₃, куриный OVA₂₅₇₋₂₆₄, куриный OVA₃₂₃₋₃₃₉ и мышинный I-E α ₅₂₋₆₈. Клеточная линия Quad-G1261 также стабильно экспрессирует люциферазу, что позволяет отслеживать рост опухоли с помощью билюминесценции.

Целью настоящего исследования была оценка эффективности комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, на модели глиобластомы Quad-G1261.

Воздействие комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, а именно: Z13Mad5Анаха (см.

пример 7) оценивали с использованием описанной выше модели глиобластомы. При этом анализировали Т-клеточный хоминг в области опухоли у мышей, несущих опухоль G1261-Quad, которых вакцинировали дважды (Wk1 и Wk3) вакциной Z13Mad5Анаха. Группу, вакцинированную Z13Mad5 и Анаха (в дозе, эквивалентной Z13Mad5Анаха), которые вводили индивидуально, применяли в качестве контроля. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.c. (внутри черепа) 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (в d7 и d21 после имплантации) путем s.c.-инъекции в дозе 2 нмоль Z13Mad5Анаха (группа 1) или 2 нмоль Z13Mad5 и 2 нмоль Анаха (группа 2). В Wk4 анализировали кровь и инфильтрующие головной мозг лейкоциты (BIL), при этом количественно оценивали SIINFEKL-специфические CD8-Т-клетки в крови и в BIL в d28 путем окрашивания мультиметром (5-8 мышей на группу). Результаты представлены на фиг. 34.

В целом, в крови обнаружена низкая частота встречаемости SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток. Однако более высокий процент SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток обнаружен в крови вакцинированных Z13Mad5Анаха мышей. Во всех группах обнаружена существенно более сильная аккумуляция SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток в BIL.

После двух вакцинаций Z13Mad5 Анаха частота встречаемости SIINFEKL-специфических CD8⁺-Т-клеток в BIL оказалась в 2 раза выше (24%), чем при применении Z13Mad5 + Анаха (12%).

Затем оценивали секрецию цитокинов. Для этого мышам линии C57BL/6 имплантировали i.c. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (d7 и 21) путем s.c.-инъекции, используя в дозе 2 нмоль Z13Mad5Анаха или 2 нмоль Z13Mad5 и 2 нмоль Анаха. BIL выделяли и культивировали в течение 6 ч со зрелыми BMDC, загруженными или не загруженными пептидом SIINFEKL, в присутствии брэфелдина А перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов. Результаты представлены на фиг. 35.

Несмотря на гетерогенность, обнаружен высокий уровень секреции цитокинов для инфильтрующих головной мозг CD8-Т-клеток из мышей, вакцинированных Z13Mad5Анаха. Эти результаты продемонстрировали, что вакцина Z13Mad5Анаха обладала способностью вызывать более сильный SIINFEKL-специфический CD8-Т-клеточный иммунный ответ в головном мозге несущих опухоли мышей с выраженной эффекторной функцией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Z13Mad5Анаха обладает эффективностью в отношении вызывания иммунного ответа инфильтрующих головной мозг SIINFEKL-специфических CD8-Т-клеток. Z13Mad5Анаха обладает способностью усиливать секрецию цитокинов антигенспецифическими CD8-Т-клетками в головном мозге.

Пример 21. Эффективность вакцины в отношении выживаемости на модели глиобластомы G1261-Quad.

В независимом эксперименте осуществляли мониторинг выживаемости мышей, вакцинированных контролем и Z13Mad5Анаха. Терапевтический режим включал три последовательные вакцинации с использованием в дозе 2 нмоль Z13Mad5Анаха в дни 7, 21 и 35 после i.e.-имплантации опухоли.

Мышам линии C57BL/6 имплантировали i.c. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали три раза (d7, d21 и d35) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Анаха в дозе 2 нмоль. Мышей ежедневно взвешивали и умерщвляли, когда потеря веса достигала более чем 15%. Результаты представлены на фиг. 36.

Результаты продемонстрировали, что терапевтическая вакцинация Z13Mad5Анаха является более эффективной, чем в контрольной группе, удлиняя медиану выживаемости на 10 дней.

Пример 22. Эффективность вакцины на подкожной модели опухоли -профилактический режим.

Этот опыт базировался на результатах, полученных в примере 10, которые представлены на фиг. 17-19.

Для оценки воздействия конъюгированных с Анаха конструкций белков, описанных в примере 7, на контроль роста опухолей использовали стандартную модель опухоли, а именно: s.c.-имплантацию клеток тимомы EG.7-OVA. В противоположность примеру 10, в котором вакцинацию осуществляли в дни 5 и 13, в настоящем исследовании использовали профилактический режим, при котором мышам вакцинировали за 21 и 7 дней до имплантации опухоли.

Мышей линии C57BL/6 вакцинировали дважды (d-21 и d-7) путем s.c.-инъекции, используя в дозе 0,5 нмоль Z13Mad5Анаха, в правую боковую область, а затем имплантировали в день 0 s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля.

Результаты, представленные на фиг. 37, касаются объема опухолей (фиг. 37 А) и уровня выживаемости (фиг. 37Б). Данные демонстрируют, что профилактическая вакцинация с использованием Z13Mad5Анаха обладала высокой эффективностью в отношении контроля роста опухолей и уровня выживаемости. Объем опухолей существенно снижился у мышей, обработанных Z13Mad5Анаха, по сравнению с контрольными мышами. Уровень выживаемости существенно повышался у мышей, обработанных Z13Mad5Анаха, по сравнению с контрольными мышами.

Пример 23. Эффективность вакцины на подкожной модели опухоли - терапевтический режим на развитых опухолях.

Этот опыт базировался на результатах, полученных в примере 10, которые представлены на фиг. 17-19, и на результатах, полученных в примере 22, которые представлены на фиг. 37. Целью настоящего

исследования была оценка воздействия Z13Mad5Anaxa (см. пример 7) на развитую опухоль.

Для этой цели применяли s.c.-модель, полученную с использованием клеток меланомы B16-OVA. В этой модели опухолевые клетки размножались медленно, что позволяло создавать большее окно продолжительности вакцинации.

Первую вакцинацию с использованием Z13Mad5Anaxa в низкой дозе 0,5 нмоль осуществляли при наличии развитой и видимой невооруженным глазом опухоли, т.е. в день 14 после имплантации опухолевых клеток. Вторую вакцинацию осуществляли в день 21.

Таким образом, мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 1×10^5 опухолевых клеток B16-OVA в левую боковую область и вакцинировали дважды (d14 и d21) путем s.c.-инъекции в дозе 0,5 нмоль Z13Mad5Anaxa в правую боковую область. Осуществляли мониторинг роста опухолей и строили кривые выживаемости. Результаты представлены на фиг. 38.

Результаты продемонстрировали, что Z13Mad5Anaxa эффективно контролировала рост развитых и видимых невооруженным глазом опухолей. Кроме того, несмотря на присутствие развитых и видимых невооруженным глазом опухолей уровни выживаемости повышались у мышей, обработанных Z13Mad5Anaxa, по сравнению с контролями.

Пример 24. Эффективность вакцины на подкожной модели опухоли - терапевтический режим: роль CPP.

Протокол этого исследования соответствовал протоколу опыта, описанного в примере 10, только с тем различием, что оценивали дополнительную группу "Mad5Anaxa" (см. пример 16).

В целом, метод состоял в следующем: использовали стандартную модель опухоли, а именно: полученную в результате s.c.-имплантации клеток тимомы EG.7-OVA. Мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область. После имплантации опухолей группы по 7 мышей в каждой вакцинировали s.c. в правую боковую область в день 5 и 13 путем подкожной инъекции, используя в дозе 0,5 нмоль либо Z13Mad5Anaxa (группа 1), либо Mad5Anaxa (группа 2), и сравнивали с контрольной группой. Размер опухоли определяли с помощью кронциркуля. Результаты представлены на фиг. 39.

Результаты продемонстрировали, что у мышей, обработанных Z13Mad5Anaxa, обнаружено существенное снижение объема опухоли и существенно повышение уровня выживаемости по сравнению как с контрольными мышами, так и с мышами, обработанными Mad5Anaxa, т.е. конструкцией без CPP. Эти результаты свидетельствуют о том, что присутствие CPP приводит к существенному уменьшению объема опухоли и существенному повышению уровня выживаемости, т.е. повышенной эффективности вакцинация. Таким образом, результаты продемонстрировали - в совокупности с результатами, полученными в примере 10, - что присутствие CPP и агониста TLR приводит к синергетическому действию в отношении роста опухоли и уровня выживаемости.

Пример 25. Сравнение кинетики иммунных ответов при применении комплексов, содержащих различные проникающие в клетку пептиды.

Для изучения воздействия различных CPP в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, применяли описанный выше слитый белок Z13Mad5Anaxa (см. пример 7).

Дополнительно конструировали слитые белки, содержащие CPP, отличные от Z13, а именно: Z14 (SEQ ID NO: 7) или Z18 (SEQ ID NO: 11). Указанные слитые белки содержали также белок "MAD5", который состоит из различных CD8+ и CD4-эпитопов из различных антигенов, и пептидный агонист TLR2 "Anaxa". Таким образом, создавали следующие дополнительные конструкции.

Z14Mad5Anaxa.

Последовательность

MННННННKRY KNRVASRKSР AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH
AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFЕAQG ALANIAVDKA
NLDVEQLESИ INFEKLTЕWT GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSVKP
YTNFDAE

(SEQ ID NO: 33).

Z18Mad5 Anaxa.

Последовательность

MННННННHREV AAАKSSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV
GVGALKVPRN QDWLGVPRFA KFASFЕAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESИ
NFEKLTЕWTG SSTVHEILCK LSLEGDHSTP PSAYGSVKPY TNFDAE

(SEQ ID NO: 34).

Мышей линии C57BL/6 разделяли на 8 различных групп (по 4 мыши на группу): три группы, обрабатываемые либо Z13Mad5Anaxa, либо Z14Mad5 Anaxa, либо Z18Mad5 Anaxa в дозе 2 нмоль, и соответствующий им контроль, и три группы, обрабатываемые Z13Mad5 Anaxa, Z14Mad5 Anaxa или Z18Mad5Anaxa в дозе 0,05 нмоль, и соответствующий им контроль. Мышей вакцинировали пять раз

(Week0, Week2, Week4, Week6 и Week8) s.c. У мышей брали кровь через 7 дней после 2-, 3-, 4-й и 5-й вакцинаций и осуществляли окрашивание мультимером (один эксперимент, 4 мыши на группу).

Результаты представлены на фиг. 40. Во всех группах, вакцинированных Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa или Z18Mad5Anaxa, обнаружен повышенный процент позитивных по мультимеру клеток по сравнению с контрольной группой (за исключением второй вакцинации Z18Mad5Anaxa). Эти результаты свидетельствуют о том, что комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, которые содержат различные проникающие в клетку пептиды, обладают способностью вызывать иммунный ответ при их применении в различных дозах.

Пример 26. Сравнение Т-клеточных иммунных ответов при применении комплексов, содержащих различные проникающие в клетку пептиды.

Для более детального изучения CD8-Т-клеточных иммунных ответов мышей линии C57BL/6 разделяли на три различные группы (по 3-4 мыши на группу): наивные Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa.

Мышей линии C57BL/6 из Z13Mad5Anaxa-группы и Z14Mad5Anaxa-группы вакцинировали 5 раз (Week0, Week2, Week4, Week6 и Week8) s.c, используя в дозе 2 нмоль либо Z13Mad5Anaxa (см. пример 7), либо Z14Mad5Anaxa (см. пример 25). Через 9 дней после 5-й вакцинации мышшей умерщвляли, органы изымали и осуществляли окрашивание мультимером для определения процента SIINFЕKL-специфических CD8-Т-клеток в селезенке, костном мозге и дренирующих лимфатических узлах (паховых и подмышечных).

Результаты представлены на фиг. 41. У мышшей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa, обнаружено сходное увеличение позитивных по мультимеру клеток, в частности, в селезенке и костном мозге, а также небольшое увеличение дренирующих лимфатических узлов.

Для дополнительного изучения эффекторной функции CD8-Т-клеток после вакцинации комплексами с различными CPP, в те же группах мышшей, которые описаны выше, осуществляли Elispot-анализ клеток селезенки, стимулированных пептидом SIINFЕKL-OVACD8+(SEQ ID NO: 35), через 9 дней после 5-ой вакцинации для количественного определения продуцирующих IFN- γ клеток.

Результаты представлены на фиг. 42А. У мышшей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa, обнаружено существенное увеличение продуцирующих IFN- γ клеток по сравнению с наивными мышями. У мышшей, вакцинированных Z14Mad5Anaxa, также обнаружено увеличение продуцирующих IFN- γ клеток по сравнению с наивными мышями, однако увеличение оказалось не значимым, что может являться следствием небольшого количества мышшей (3 мыши в обработанной Z14Mad5Anaxa группе).

Для изучения CD4-Т-клеточных ответов после вакцинации комплексами, содержащими разные CPP, в тех же группах мышшей, которые описаны выше, осуществляли Elispot-анализ клеток селезенки, стимулированных пептидом SIINFЕKL-OVACD4 (SEQ ID NO: 36), через 9 дней после 5-й вакцинации для количественного определения продуцирующих IFN- γ клеток.

Результаты представлены на фиг. 42Б. У мышшей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa, обнаружено очень существенно повышение количества продуцирующих IFN- γ клеток по сравнению с наивными мышями. У мышшей, вакцинированных Z14Mad5Anaxa, также обнаружено увеличение продуцирующих IFN- γ клеток по сравнению с наивными мышями, однако увеличение оказалось не значимым, что может являться следствием небольшого количества мышшей (3 мыши в обработанной Z14Mad5Anaxa группе).

Кроме того, у описанных выше групп мышшей осуществляли внутриклеточное окрашивание клеток селезенки, стимулированных пептидом SIINFЕKL OVACD8+(SEQ ID NO: 35), для идентификации CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺-клеток. Результаты представлены на фиг. 43. У мышшей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa, обнаружено сходное увеличение CD 107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺-клеток.

Пример 27. Сравнение действия комплексов, содержащих различные проникающие в клетку пептиды, на рост опухолей и выживаемость на s.c-модели EG.7-OVA.

Для изучения воздействий комплексов, содержащих различные проникающие в клетку пептиды, на рост опухолей и выживаемость использовали s.c.-модель, созданную с использованием клеток EG.7-OVA. В d0 мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и разделяли на три различные группы (наивные, Z13Mad5Anaxa и Z14Mad5Anaxa). Мышей вакцинировали дважды в d5 и d13 после имплантации опухолей путем s.c.-инъекции, используя в дозе 0,5 нмоль Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa, в правую боковую область.

Результаты представлены на фиг. 44. Вакцинация Z13Mad5Anaxa или Z14Mad5Anaxa приводила к существенному снижению объемов опухолей по сравнению с контрольными мышями (фиг. 44 А), а также к существенному повышению уровней выживаемости по сравнению с контрольными мышями (фиг. 44 Б). Эти результаты продемонстрировали, что оба комплекса, и Z13Mad5Anaxa и Z14Mad5Anaxa, обладали способностью существенно снижать рост опухолей и существенно пролонгировать выживаемость.

Пример 28. Сравнение иммунных ответов после вакцинации комплексами, содержащими различные проникающие в клетку пептиды.

В этом эксперименте изучали воздействие различных CPP в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, с использованием комплекса с агонистом TLR "EDA". Для этого применяли описанный выше слитый белок EDAZ13Mad5 (см. пример 1).

Кроме того, дополнительно создавали слитые белки, которые содержали CPP, отличные от Z13, а именно: Z14 (SEQ ID NO: 7) или 18 (SEQ ID NO: 11). Указанные слитые белки содержали также белок "MAD5", состоящий из различных CD8+ и CD4+-эпитопов из различных антигенов, и пептидный агонист TLR4 "EDA". Таким образом, дополнительно создавали следующие конструкции.

EDAZ14Mad5.

Последовательность

MНННННННID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI
RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY
KNRVASRKSAR AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV
VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI
INFEKLTWT GS

(SEQ ID NO:37).

EDAZ18Mad5.

Последовательность

MНННННННID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI
RELFPAPDGE DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV
AAAKSENDRLRLLLKESLK ISQAVHAAHAEINEAGREVV GVGALKVPRN
QDWLGVPRFA KFASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTWTGS
(SEQ ID NO: 38)

Мышей линии C57BL/6 разделяли на 8 различных группы (по 4 мыши на группу): три группы, которые обрабатывали либо EDAZ13Mad5, либо EDAZ14Mad5, либо EDAZ18Mad5 в дозе 2 нмоль, и соответствующий им контроль, и три группы, которые обрабатывали либо EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5, либо EDAZ18Mad5 в дозе 5 нмоль, и соответствующая им контрольная группа. Мышей вакцинировали три раза (неделя 0, неделя 2 и неделя 4) s.c. У мышей брали кровь через 7 дней после 2- и 3-й вакцинаций и осуществляли окрашивание мультимером (один эксперимент с 4 мышами на группу).

Результаты представлены на фиг. 45. Во всех группах, вакцинированных EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 или EDAZ18Mad5, обнаружен повышенный процент позитивных по мультимеру клеток по сравнению с контрольной группой. Эти результаты продемонстрировали, что комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, которые содержали различные проникающие в клетку пептиды, обладали способностью вызывать иммунный ответ в различных дозах.

Пример 29. Воздействие EDAZ14Mad5 на рост опухолей и выживаемость на s.c.-модели EG.7-OVA.

Для изучения воздействия EDAZ14Mad5 на рост опухоли и выживаемость использовали s.c.-модель EG.7-OVA (см. в примере 4 и на фиг. 9-11 результаты исследования EDAZ13Mad5 на такой же модели).

В d0 мышам линии C57BL/6 имплантировали s.c. 3×10^5 опухолевых клеток EG7-OVA в левую боковую область и разделяли на 2 группы (наивные и EDAZ14Mad5). Мышей вакцинировали дважды в d5 и d13 после имплантации опухолей путем s.c.-инъекции EDAZ14Mad5 в дозе 0,5 нмоль в правую боковую область.

Результаты представлены на фиг. 46. Аналогично EDAZ13Mad5 (см. пример 4, фиг. 9-11) вакцинация EDAZ14Mad5 приводила к существенному снижению объемов опухолей по сравнению с контрольными мышами (фиг. 46 А), а также к существенному повышению уровней выживаемости (фиг. 46 Б). Указанные результаты продемонстрировали, что конструкция EDAZ14Mad5 обладала способностью существенно снижать рост опухолей и существенно пролонгировать выживаемость - аналогично EDAZ13Mad5 (см. пример 4, фиг. 9-11).

Пример 30. Повышенная эффективность слитой конструкции Z13Mad5Апаха по сравнению с Z13Mad5 и Апаха на модели глиобластомы.

Для изучения эффективности комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, была выбрана модель глиобластомы (см. пример 20). Так, Z13Mad5Апаха (см. пример 7; SEQ ID NO: 28) вводили одной группе мышей, а Z13Mad5 (SEQ ID NO: 29) и Апаха (SEQ ID NO: 15) вводили (вместе) другой группе мышей.

Т-клеточный хоминг в области опухоли анализировали у несущих опухоль линии G1261-Quad мышей (7-16 мышей на группу), которых вакцинировали дважды, а именно: день 7 и день 21 после имплантации опухолей (день 0), используя вакцину Z13Mad5Апаха в дозе 2 нмоль. Группу, вакцинированную и Z13Mad5, и Апаха (в дозе, эквивалентной Z13Mad5Апаха), применяли в качестве контроля. В целом, метод состоял в следующем: мышам линии C57BL/6 имплантировали i.c. (внутри черепа) 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (в d7 и d21 после имплантации) путем s.c.-инъекции Z13Mad5 Апаха в дозе 2 нмоль (группа 1) или Z13Mad5 в дозе 2 нмоль и Апаха в дозе 2 нмоль (группа 2). В день 28 анализировали кровь и инфильтрующие головной мозг лейкоциты (BIL), при этом количест-

венно оценивали SIINFEKL-специфические CD8-T-клетки в крови и BIL в d28 путем окрашивания мультимером (7-16 мышей на группу).

Результаты представлены на фиг. 47. Обнаружен существенно более высокий процент SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток в крови вакцинированных Z13Mad5Anaxa мышей по сравнению с мышами, вакцинированными Z13Mad5, и Anaxa (фиг. 47A). Аналогично этому, обнаружено более сильное накопление SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток в BIL у вакцинированных Z13Mad5Anaxa мышей по сравнению с мышами, вакцинированными по отдельности Z13Mad5 и Anaxa (фиг. 47Б, $p = 0,0539$).

Далее оценивали секрецию цитокинов. Для этого мышам линии C57BL/6 имплантировали i.e. 5×10^5 опухолевых клеток G1261-Quad и вакцинировали дважды (d7 и 21) путем s.c.-инъекции Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль или Z13Mad5 в дозе 2 нмоль и Anaxa в дозе 2 нмоль. BIL выделяли и культивировали в течение 6 ч со зрелыми BMDC, загруженными или не загруженными пептидом S11NFEKL (SEQ ID NO: 35), в присутствии брэфелдина А перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов.

Результаты представлены на фиг. 48. В целом, более высокий уровень секреции цитокинов обнаружен для инфильтрующих головной мозг CD8-T-клеток из мышей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa. В частности, существенно более высокий уровень секреции общего IFN- γ и IFN- γ и TNF- α вместе обнаружен для инфильтрующих головной мозг CD8-T-клеток из мышей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa, по сравнению с мышами, вакцинированными по отдельности Z13Mad5 и Anaxa.

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что вакцина Z13Mad5Anaxa (по сравнению с введением по отдельности Z13Mad5 и Anaxa) обладала способностью вызывать более сильный SIINFEKL-специфический CD8-T клеточный иммунный ответ в головном мозге несущих опухоли мышей с выраженной эффекторной функцией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Z13Mad5Anaxa является эффективной в отношении вызывания высокого иммунного ответа инфильтрующих головной мозг SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток. Z13Mad5 Anaxa также обладает способностью усиливать секрецию цитокинов антигенспецифическими CD8-T-клетками в головном мозге.

Пример 31. Воздействие других антигенных карго-молекул в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Для изучения воздействия различных антигенных карго-молекул ("Mad8") создавали другой комплекс, содержащий проникающий в клетку пептид, различные антигены и пептидный агонист TLR ("Z13Mad8Anaxa"). Z13Mad8Anaxa отличался от Z13Mad5 Anaxa (описанного в примере 7) антигенными карго-молекулами. В частности, "Z13Mad8Anaxa" представляет собой слитый белок, содержащий проникающий в клетку пептид "Z13", антигенную карго-молекулу "MAD8", которая содержит CD8- и CD4-эпитопы гликопротеина 70, и пептидный агонист TLR "Anaxa". Ниже представлена аминокислотная последовательность Z13Mad8Anaxa, в которой проникающий в клетку пептид "Z13" подчеркнут, а пептидный агонист TLR "Anaxa" обозначен курсивом

KRYKNRVASR KSRAKFKQLL QHYREVA AAK SSENDRLRLLK

VTYHSPSYAY HQFERRAILN RLVQFIKDRI SVVQALVLT S TVHEILCKLS

LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

(SEQ ID NO:39).

Наивных мышей линии Balb/c (4 мыши на группу) вакцинировали 4 раза s.c. (неделя 0, неделя 2, неделя 4 и неделя 6) Z13Mad8Anaxa в дозе 2 нмоль.

Для изучения CD4-T-клеточных ответов после вакцинации через 1 неделю после 4-й вакцинации мышей умерщвляли; изымали органы и осуществляли ex vivo Elispot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидом gp70CD4 (SEQ ID NO: 64) или пептидом gp70CD4+(SEQ ID NO: 65), для количественной оценки продуцирующих IFN- γ эпитопспецифических CD4- и CD8-T-клеток.

Результаты представлены на фиг. 49. У мышей, вакцинированных Z13Mad8Anaxa, обнаружено существенное увеличение продуцирующих IFN- γ клеток по сравнению с наивными мышами. Эти данные демонстрируют, что вакцина Z13Mad8Anaxa обладала способностью вызывать эффективный иммунный ответ эпитопспецифических CD8- и CD4-T-клеток, и поэтому комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, может вызывать иммунный ответ на аутоантиген.

Пример 32. Воздействие других антигенных карго-молекул в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Для изучения воздействия дополнительных других антигенных карго-молекул ("Mad11") создавали другой комплекс, содержащий проникающий в клетку пептид, другие антигены и пептидный агонист TLR ("Z13Mad11Anaxa"). Z13Mad11Anaxa отличался от Z13Mad5Anaxa (описанного в примере 7) антигенными карго-молекулами. В частности, "Z13Mad11Anaxa" представляет собой слитый белок, содержащий проникающий в клетку пептид "Z13", антигенную карго-молекулу "MAD 11", содержащую два CD8-эпитопа сурвивина, подробно описанных у Derouazi M., Wang Y., Marlu R. и др. Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: Application to TRP-2. Bioengineered Bugs. 1(1), 2010, сс. 51-60, doi:10.4161/bbug.1.1.9482, и пептидный агонист TLR "Anaxa". Ниже представ-

лена аминокислотная последовательность Z13Mad11Anaxa, в которой проникающий в клетку пептид "Z13" подчеркнут, а пептидный агонист TLR "Anaxa" обозначен курсивом

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKKNYRIATFK
 NWPFLEDCAMEELTVSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYT
 NFDAAE

(SEQ ID NO: 40).

Наивным мышам линии C57BL/6 (5 мышей на группу) имплантировали *i.v.* 1×10^5 опухолевых клеток меланомы B16 и вакцинировали дважды (d0 и d10) путем подкожной инъекции Z13Mad11 Anaxa в дозе 1 нмоль. В день 18 мышей умерщвляли, органы изымали и осуществляли *ex vivo* Eli spot-анализ на клетках селезенки, стимулированных пептидами сурвивина сурвивин20-28 (SEQ ID NO: 67) и сурвивин 97-104: (SEQ ID NO: 68) для количественной оценки продуцирующих IFN- γ сурвивинспецифических Т-клеток.

Результаты представлены на фиг. 50. У мышей, вакцинированных Z13Mad11Anaxa, обнаружено меньшее количество метастазов по сравнению с наивными мышами (фиг. 50А). Кроме того, в селезенке мышей, вакцинированных Z13Mad11Anaxa, существенно увеличено количество продуцирующих IFN- γ сурвивинспецифических Т-клеток (фиг. 49Б).

Полученные результаты продемонстрировали, что Z13Mad11 Anaxa обладает эффективностью в отношении уменьшения количества метастазов, и Z13Mad11Anaxa может усиливать секрецию цитокинов антигенспецифическими CD8-Т-клетками в селезенке.

Пример 33. Воздействие других антигенных карго-молекул в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Для изучения воздействия дополнительных других антигенных карго-молекул ("Mad9") создавали другой комплекс, содержащий проникающий в клетку пептид, другой антиген и пептидный агонист TLR ("Z13Mad9Anaxa"). Z13Mad9Anaxa отличался от Z13Mad5 Anaxa (описанного в примере 7) антигенной карго-молекулой. В частности, "Z13Mad9Anaxa" представляет собой слитый белок, содержащий проникающий в клетку пептид "Z13", антигенную карго-молекулу "Mad9", содержащую неоантиген, описанный у Yadav и др. Nature. 515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576, из линии опухолевых клеток MC-38, и пептидный агонист TLR "Anaxa". Ниже представлена аминокислотная последовательность Z13Mad9Anaxa, в которой проникающий в клетку пептид "Z13" подчеркнут, а пептидный агонист TLR "Anaxa" обозначен курсивом

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLKHNLELASM
 TNMELMSSIVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAAE

(SEQ ID NO: 41).

Наивных мышей линии C57BL/6 (4 мыши на группу) вакцинировали 4 раза *s.c.* (неделя 0, неделя 2, неделя 4 и неделя 6), используя Z13Mad9Anaxa в дозе 2 нмоль. Для изучения CD8-Т-клеточных ответов после вакцинации через 1 неделю после 4-й вакцинации мышей умерщвляли, органы изымали и осуществляли Elispot-анализ на клетках селезенки после рестимуляции *in vitro* на 7 день с использованием стимуляции пептидом adpgk (SEQ ID NO: 66) для количественной оценки продуцирующих IFN- γ эпитопспецифических CD8-Т-клеток.

Результаты представлены на фиг. 51. У мышей, вакцинированных Z13Mad9Anaxa, обнаружено существенное увеличение эффекторных неоантигенспецифических CD8-Т-клеток по сравнению с наивными мышами.

Пример 34. Сравнение иммунных ответов после вакцинации комплексами, имеющими различные проникающие в клетку пептиды.

В этом эксперименте изучали воздействие дополнительного другого CPP в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении, используя комплекс, содержащий агонист TLR "Anaxa". Для этого использовали слитый белок Z13Mad5Anaxa, описанный выше (см. пример 7, SEQ ID NO: 28).

Кроме того, создавали дополнительный слитый белок, который содержал TAT-CPP, объединенный с линкерами фурина, описанный у Lu и др., Multiepitope trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses J. Immunol., 172, 2004, сс. 4575-4582. Указанный слитый белок содержал также белок "MAD5", состоящий из различных CD8⁺- и CD4⁺-эпитопов из различных антигенов, и пептидный агонист TLR4 "Anaxa". Таким образом, дополнительно создавали следующую конструкцию.

TatFMad5Anaxa.

Последовательность

RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRRVKKRVPRNQDWLRVKRASFEA
 QGALANIAVDKARVKRSIINFELKRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVK
 PYTNFDAAE

(SEQ ID NO: 46).

Мышей линии C57BL/6 разделяли на три различные группы (8 мышей на группу): одна группа, которую обрабатывали Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль, одна группа, которую обрабатывали TatFMad5Anaxa в дозе 2 нмоль, и соответствующий контроль. Мышей вакцинировали два раза (неделя 0 и неделя 2) s.c, используя либо Z13Mad5Anaxa в дозе 2 нмоль, либо TatFMad5Anaxa в дозе 2 нмоль. У мышей брали кровь через 7 дней после 2-й вакцинации и осуществляли окрашивание мультимером (8 мышей на группу).

Результаты представлены на фиг. 52. У мышей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa или TatFMad5Anaxa, обнаружен повышенный процент позитивных по мультимеру клеток по сравнению с контрольной группой. Эти результаты свидетельствуют о том, что комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, которые имеют различные проникающие в клетку пептиды, могут вызывать иммунный ответ в различных дозах. Однако CPP, полученный из ZEBRA (Z13), оказался лучше, чем TAT-CPP.

Пример 35. Повышенная эффективность слитой конструкции Z13Mad5Anaxa по сравнению с Z13Mad5 и Anaxa на наивных мышях.

Далее эффективность комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, изучали на наивных мышях. Для этого Z13Mad5Anaxa (см. пример 7; SEQ ID NO: 28) вводили одной группе мышей, а Z13Mad5 (SEQ ID NO: 29) и Anaxa (SEQ ID NO: 15) вводили (совместно) другой группе мышей.

Мышей линии C57BL/6 из Z13Mad5Anaxa-группы и Z13Mad5 + Anaxa-группы вакцинировали однократно (неделя 0) путем s.c.-инъекции в дозе 2 нмоль Z13Mad5 Anaxa (группа 1) или 2 нмоль Z13Mad5 и 2 нмоль Anaxa (группа 2). В день 14 анализировали кровь, оценивая количественно SIINFEKL-специфические CD8-T-клетки в крови путем окрашивания мультимером (4-8 мышей на группу).

Результаты представлены на фиг. 53. Обнаружен существенно более высокий процент SIINFEKL-специфических CD8-T-клеток в крови мышей, вакцинированных Z13Mad5Anaxa, по сравнению с мышами, вакцинированными Z13Mad5 и Anaxa по отдельности (фиг. 53).

В совокупности эти результаты продемонстрировали, что вакцина Z13Mad5Anaxa (по сравнению с введением Z13Mad5 и Anaxa по отдельности) обладала способностью вызывать более сильный SIINFEKL-специфический CD8-T-клеточный периферический иммунный ответ.

Пример 36. Воздействие другой антигенной карго-молекулы в комплексе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Для изучения воздействия дополнительной другой антигенной карго-молекулы ("Mad 12") создавали другой комплекс, содержащий проникающий в клетку пептид, другой антиген и пептидный агонист TLR ("Z13Mad12Anaxa"). Z13Mad12Anaxa отличался от Z13Mad5 Anaxa (описанного в примере 7) антигенной карго-молекулой. В частности, "Z13Mad12Anaxa" представляет собой слитый белок, содержащий проникающий в клетку пептид "Z13", антигенную карго-молекулу "MAD 12", которая содержит три неоантигена, описанные у Yadav и др. Nature. 515(7528), 27 ноября 2014 г., сс. 572-576, из линии опухолевых клеток MC-38, и пептидный агонист TLR "Anaxa". Ниже представлена аминокислотная последовательность Z13Mad 12Anaxa

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVA AAKSSENDRLRLLLKLFRAAQL

ANDVVLQIMENHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLE

GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

(SEQ ID NO: 69).

Наивных мышей линии C57BL/6 (4 мыши на группу) вакцинировали дважды s.c. (неделя 0, неделя 2), используя Z13Mad12Anaxa в дозе 2 нмоль. Для изучения CD8-T-клеточных ответов после вакцинации через 1 неделю после 2-й вакцинации анализировали кровь, при этом количественно оценивали специфические в отношении неоантигена *gaps1* CD8-T-клетки в крови путем окрашивания мультимером (4 мыши на группу).

Результаты представлены на фиг. 54. У мышей, вакцинированных Z13Mad12Anaxa, обнаружено существенное увеличение эффекторных неоантигенспецифических CD8-T-клеток по сравнению с наивными мышами.

Пример 37. Созревание *in vitro* человеческих дендритных клеток.

В основу этого исследования была положена задача изучить способность комплекса, предназначенного для применения согласно настоящему изобретению ("Z13Mad5Anaxa", SEQ ID NO: 28, см. пример 7), индуцировать созревание дендритных клеток в сравнении с комплексом, в котором отсутствует пептидный агонист TLR ("Z13Mad5", SEQ ID NO: 29, см. пример 1).

Полипептид Z13Mad5Anaxa и полипептид Z13Mad5 исследовали в отношении их способности индуцировать созревание человеческих дендритных клеток (DC). После инкубации в течение ночи с использованием 300 нМ белка оценивали экспрессию маркеров активации (CD86, CD80, CD83 и HLA-DR) на человеческих DC с помощью FACS (фиг. 55). В качестве отрицательного контроля для каждого белка применяли в таких же объемах буфер.

Результаты представлены на фиг. 55. В то время как комплекс Z13Mad5Anaxa индуцировал созревание человеческих DC, о чем свидетельствует повышающая регуляция CD86, HLA-DR и CD83, Z13Mad5 не обладал способностью активировать человеческие DC. Эти результаты свидетельствуют о том, что компонент белка, представляющий собой Anaxa, ответствен за повышающую регуляцию маркеров акти-

вации на человеческих DC.

Таблицы последовательностей и номера SEQ ID (Перечень последовательностей)

SEQ ID NO	Последовательность	Примечания
SEQ ID NO: 1	RQIKIYFQNRMRKWKK	СРР: пенетратин
SEQ ID NO: 2	YGRKKRRQRRR	СРР: минимальный домен ТАТ
SEQ ID NO: 3	MMDPNSTSEDEVKFTDPYQVPFVQAFDQATR VYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPPEPLPQGQLT AYHVSTAPTGSWFSAPQPAPENAYQAYAAP QLFPVSDITQNNQTNQAGGEAPQPGDNSTVQ TAAAVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVA APARRTRKPPQPESEECDSLEIKRYKNRVA SRKCRKFKQLLQHYREVAANKSSENDRLRL LLKQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF	Аминокислотная последовательность ZEBRA (встречающаяся в естественных условиях последовательность из вируса Эпштейна-Барра (EBV)) (YP_401673)
SEQ ID NO: 4	KRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAA KSENDRLRLLKQMC	СРР1 (Z11)
SEQ ID NO: 5	KRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAA KSENDRLRLLK	СРР2 (Z12)
SEQ ID NO: 6	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAA SENDRLRLLK	СРР3 (Z13)
SEQ ID NO: 7	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAA	СРР4 (Z14)

SEQ ID NO: 8	KRYKNRVASRKSRAKFK	CPP5 (Z15)
SEQ ID NO: 9	QHYREVAALKSSSEND	CPP6 (Z16)
SEQ ID NO: 10	QLLQHYREVAALK	CPP7 (Z17)
SEQ ID NO: 11	REVAALKSSSENDRLRLLLK	CPP8 (Z18)
SEQ ID NO: 12	KRYKNRVA	CPP9 (Z19)
SEQ ID NO: 13	VASRKSRAKFK	CPP10 (Z20)
SEQ ID NO: 14	ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVGV GALKVPRNQDWLGVPRFAKFAFASFEAQ GALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTWTGS	карго-молекула MAD5
SEQ ID NO: 15	STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFD AE	пептидный агонист TLR2 Анаха
SEQ ID NO: 16	DDDK	сайт-мишень для энтерокиназы
SEQ ID NO: 17	IEDGR	сайт-мишень для фактора Ха
SEQ ID NO: 18	LVPRGS	сайт-мишень для тромбина
SEQ ID NO: 19	ENLYFQG	сайт-мишень для протеазы TEV
SEQ ID NO: 20	LEVLFGQP	сайт-мишень для протеазы PreScission
SEQ ID NO: 21	RX(R/K)R	сайт-мишень для фурина
SEQ ID NO: 22	GGGGG	пептидный линкер
SEQ ID NO: 23	GGGG	пептидный линкер
SEQ ID NO: 24	EQLE	пептидный линкер
SEQ ID NO: 25	TEWT	пептидный линкер
SEQ ID NO: 26	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIK IAWESPQQVSRVRYTYSSPEDGIRELF PAPDGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVA LHDDMESQPLIGIQSTKRYKNRVASRK SRAKFKQLLQHYREVAALKSSSENDRLR LLLKESLKISQAVHAAHAEINEAGREV VGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKFAFAS EAQGALANIAVDKANLDVEQLESIINFE KLTWTGS	EDAZ13Mad5
SEQ ID NO: 27	MHHHHHHSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVK PYTNFDAEKRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREV AAKSSSENDRLRLLLKESLKISQAVHAAHAEINEA GREVVGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKFAFASFEAQG ALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTWTGS	AnaxaZ13Mad5
SEQ ID NO: 28	MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYRE VAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKFAFASFEAQ GALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTWTGSST VHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 29	MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYRE VAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPRFAKFAFASFEA	Z13Mad5

	QGALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTEWTGS	
SEQ ID NO: 30	MHHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGV GALKVPRNQDWLGVPFPAKFAFASFEAQGALANIAV DKANLDVEQLESIINFEKLTEWTGS	Mad5
SEQ ID NO: 31	MHHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQG QVSRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQSTESLKISQAV HAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQDWLGVP FAKFAFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIINFE KLTEWTGS	EdaMad5
SEQ ID NO: 32	MHHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGV GALKVPRNQDWLGVPFPAKFAFASFEAQGALAN IAVDKANLDVEQLESIINFEKLTEWTGSSTVHEI LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 33	MHHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYR EVAANKESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGV GALKVPRNQDWLGVPFPAKFAFASFEAQGALANI AVDKANLDVEQLESIINFEKLTEWTGSSTVHEIL CKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z14 Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 34	MHHHHHHHREVAANKSENDRLRLLKESLKIS QAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQDW LGVPFPAKFAFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQ LESIINFEKLTEWTGSSTVHEILCKLSLEGDHSTP PSAYGSVKPYTNFDAE	Z18 Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 35	SIINFEKL	SIINFEKL OVACD8
SEQ ID NO: 36	ISQAVHAAHAEINEAGR	пептид OVACD4
SEQ ID NO: 37	MHHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESP QGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAE LQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQSTK RYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAANKESL KISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQ DWLGVPFPAKFAFASFEAQGALANIAVDKANLDV EQLESIINFEKLTEWTGS	EDAZ14Mad5
SEQ ID NO: 38	MHHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESP QGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAE LQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQSTR EVAANKSENDRLRLLKESLKISQAVHAAHAE INEAGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFPAKFA SFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTE WTGS	EDAZ18Mad5
SEQ ID NO: 39	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAANKSS ENDRLRLLLVKTYHSPSYAYHQFERRAILNRLV QFIKDRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHST PPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad8Anaxa
SEQ ID NO: 40	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAANKSS ENDRLRLLLVKNYRIATFKNWPFLEDCAMEELT VSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTNFDAE	Z13Mad11Anaxa
SEQ ID NO: 41	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAANKSS ENDRLRLLLVKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEI LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad9Anaxa
SEQ ID NO: 42	HLELASMTNMELMSSIV	Mad9
SEQ ID NO: 43	VTYHSPSYAYHQFERRAILN RLVQFIKDRISVVQALVLT	Mad8
SEQ ID NO: 44	NYRIATFKNWPFLEDCAMEELTVSEFLKLDQR	Mad11

SEQ ID NO: 45	NIDRPKGLAFTD VDVDSIKIAWESPQGQVSR YR VTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRPGSE YTVSVVALHDDMESQPLIGIQT	EDA
SEQ ID NO: 46	RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGR RV KRK VPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVDK ARVKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHS TPPSAYGSVKPYTNFDAE	TatFMad5Anaxa
SEQ ID NO: 47	MAPPQVLAFLGLLAAATATFAAAQEECVCENY KLA VNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAA KCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNN DGLY DPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRR TDKDTEITCSERVRTYWIIE LKHKAREKPYDSK SLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVIDL VQNSSQKTQNDVDIADVA YYFEKDVKGESLFH SKKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEF SMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKK RMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA	EpCAM
SEQ ID NO: 48	GLKAGVIAV	эпитоп EpCAM
SEQ ID NO: 49	MTPGTQSPFFLLLLLTLVLT VVTGSGHASSTPGG EKETSATQRSSVPSSTEKNAVSM TSSVLSSHSPG SGSSTTQGDVTLAPATEPASGSAATWGQDVT SVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTA PPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTR PAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT RPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPD TRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPG STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA PGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA PPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTR PAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV TSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT RPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALGSTAPPVHN VTSASGSASGSASTLVHNGTSARATTT PASKST PFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSVPPL TSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKF RPGSVVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTE AASRYNLTISDVSVSDVPPFSAQSGAGVPGWG IALLVLCVLAIAIVYLIALAVCQRRKNYGQ LDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDR SPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL	MUC-1
SEQ ID NO: 50	GSTAPPVHN	эпитоп MUC-1
SEQ ID	TAPPAHGVTS	эпитоп MUC-1

NO: 51		
SEQ ID NO: 52	MGAPTLPPAWQPFLKDHRIKTFKNWPFLEGCAC TPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFKFELEG WEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLG EFLKLDREKAKNIAKETNKKKFEFEETAKKV RRAIEQLAAMD	сурвивин
SEQ ID NO: 53	RISTFKNWPF	эпитоп сурвивина
SEQ ID NO: 54	MESPSAPPHRWCIWQRLLLTASLLTFWNPPTT AKLTIESTPFNVAEGKEVLLL VHNLPQHLLFGYS WYKGERVDGNRQIIGYVIGTQATPGPAYSGR EIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEE ATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFT CEPETQDATYLWWVNNQSLPVSRLQLSNGNR TLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVIL NVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNSCHAASN PPAQYSWVFNQTFQSTQELFIPNITVNNSGSYT CQAHNSDTGLNRRTVTITVYAEPKPFITSNNS NPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLP VSPRLQLSNDNRLLSVTRNDVGPYECGIQN KLSVDHSDPVILNVLYGDDPTISPSYTYRPGV NLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQHTQELFIS NITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTTVSA ELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTT YLWWVNGQSLPVSRLQLSNGNRLLTLFNVTR NDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPD PIISPPDSSYLSGANLNSCHSASNPSPQYSWRIN GIPQHTQVLFIAKITPNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLV GVAL	CEA
SEQ ID NO: 55	YLSGANLNS	эпитоп CEA
SEQ ID NO: 56	SWRINGIPQQ	эпитоп CEA
SEQ ID NO: 57	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVDEY DPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSA MRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYRE QIKRVKDSQVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQA QDLARSYGIPFIETSAKTRQVEDAFYTLVREIR QYRLKKISKEEKTGCVKIKKCIIM	Kirsten-подтип Ras
SEQ ID NO: 58	VVGAGGVG	эпитоп Kirsten-подтипа Ras
SEQ ID NO: 59	MPLQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPA TEEQEAASSSTLVEVTLGEVPAAESDPDPQSPQ GASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEIEGPFSTFP DLESEFQAALSRKVAELVHFLLKYRAREPVTK AEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKAFSSLQLVFGIE LMEVDPIGHL YIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPK AGLLIIVLAIHAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEG REDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDP ACYEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPH ISYPPLHEWVLEEGEE	MAGE-A3
SEQ ID NO: 60	KVAELVHFL	эпитоп MAGE-A3
SEQ ID NO: 61	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSDTEIKVNPP QDFEIVDPGYLGYLYLQWQPPLSLDHFKECTVE YELKYRNIGSETWKTITKNLHYKDGFDLNGGI EAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPQG IPETKVQDMDCVYYNWQYLLCSWKPGIGVLLD TNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKADGQONIGCR	IL13Ralpha2

	FPYLEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQL QNIVKPLPPVYLTFRESSCEIKLKWSIPLGPIA RCFDYEIEIREDDTTLVATVENETYTLKTTNET RQLCFVVRSKVNIYCSDDGWSEWSDKQCWEG EDLSKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTGLLLRKPNT YPKMPEFFCDT	
SEQ ID NO: 62	LPPFGFIL	эпитоп IL13Ralpha2
SEQ ID NO: 63	LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSS IVVISASIIIVFNLELEG	<u>Mad12</u>
SEQ ID NO: 64	LVQFIKDRISVVQA	пептид gp70CD4
SEQ ID NO: 65	SPSYVYHQF	пептид gp70CD8
SEQ ID NO: 66	ASMTNMELM	пептид adpgk
SEQ ID NO: 67	ATKNWPFL	survivin20-28
SEQ ID NO: 68	TVSEFLKL	сурвивин97-104
SEQ ID NO: 69	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVA AAKSS ENDRLRLLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA SMTNMELMSSIVVISASIIIVFNLELEGSTVHEIL CKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad12Anaxa
SEQ ID NO: 70	MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGDMK LRLPASPETHLDMRLHLYQGCVVQGNLELY LPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQ RLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVT GASPPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCY QDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCS PMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCK GPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHFNH SGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGA SCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNEVTAE DGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVT SANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAP LQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVF QNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLISWLGRLSL RELGSGLALIIHINTHLCFVHTVPWDQLFRNPH QALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCW GPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY VNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVA CAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDE EGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLT SHSAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKTYT MRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETE LRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAI KVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPPYVSR LLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRL GSQDLLNWCMIQAKGMSYLEDVRLVHRDLAA RNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADG GKVPKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTWV ELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPIC TIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFREL VSEFSRMA RDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLEDDDD MGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVH HRHRSSSTRSGGGDLTGLEPSEEEAPRSPLAPS EGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPHTDPSPLQ RYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQP DVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPG	Her2/neu

	KNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQPH PPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTP TAENPEYLGLDVPV	
SEQ ID NO: 71	LEEKKGNYVVTDHC	эпитоп EGFRvIII
SEQ ID NO: 72	MELQAARACFALLWGCALAAAAAQQKEVVV LDFAAAGGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMND MPIYMYSVCNVMSGDQDNWLRTNWWVYRGEA ERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYYAE SDLDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEAR HVKLNVEERSVGPLTRKGFYLAQDIGACVALL SVRVYYKKCPPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLAT VAGTCVDHAVVPPGGEEPMMHCAVDGEWLVP GQCLCQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASESPC LECPEHTLPSPEGATSCCEEGFFRAPQDPASMP CTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPQDSSG REDIVYSVTCEQCWPESGECGPCEASVRYSEPP HGLTRTSVTSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGL VTSRSFRITASVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVS WSIPPPQQRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRR EGFSVTLDDLAPDITYLVQVQALTQEGQGAGS KVHEFQTLSPESGNLAVIGGVAVGVVLLVL AGVGFHRRRKNQRARQSPEDVYFSKSEQLKP LKTYPDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQK VIGAGEFGEVYKGMKLTSSGKKEVPVAIKTLK AGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFHHNIIRLEGI SKYKPMIITEYMEGALDKFLREKDFEVS QLVGMRLGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNI LVNSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPEATYTTSGGK IPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEVM TYGERPYWELSNHEVMKAINDFRLLPTMDCP SAIYQLMMQCWQERARRPKFADIVSILDKLIR APDSLKTLADFDPRVSIRLPSTSGSEGVPRFRTVS EWLESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTN DDIKRIGVRLPGHQKRIAYSLGLKQVNTVG IPI	EphA2
SEQ ID NO: 73	MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPNRQD WLGVSRLRTKAWNRQLYPEWTEAQRDCWR GGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSQK VLPDGGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETD DACIFPDGGPCPSGWSQKRSFYVYVWKTWGQY WQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHTMEVTYVYHR RGSRSYVPLAHSSAFTITDQVPFSVSVSQRAL DGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAADLS YTWDFGDSSTLISRALVVHTYLEPGPVTAQV VLQAAIPLTSCGSSPVPGTDDGHRPTAEAPNTT AGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSTTSVQVPTT EVISTAPVQMPAESTGMTPEKVPVSEVMGTTL AEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTAAQVTTTE WVETTARELPIPEPEGPDASSIMTESITGSLGPL LDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFVTLDIV QGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGLPKE ACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLSPACQLVLHQ ILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQ EAGLGQVPLIVGILLVMAVVLASLIYRRRLMK QDFSVPLPHSSHWLRLPRIFCSPIGENSPLLS GQQV	Gp100
SEQ ID NO: 74	MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRRLLGP QGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARP PPAAPSFRQVSLKELVARVLQRLCERGAKNVL AFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTD	hTert

	LRGSGAWGLLRRVGGDDVLVHLLARCAFLV APSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRR RLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGG ASRSLPLPKRPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPG RTRGSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTR HSHPSVGRQHHAAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYA ETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRL VETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLF LELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGV CAREKPQGSVAAPPEEDTDPRLVQLLRQHSSP WQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRN TKKFISLKGHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRR SPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYV ELLRSFFYVTTTTFQKNRLLFFYRKSVMWKLQSI GIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSR LRFIPKPDGLRPIVNDYVVGARTFRREKRAER LTSRVKALFVSLNYERARRPGLLGASVGLDDI HRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYD TIPQDRLTEVIASIIKQNTYCVRRYAVVQKAA HGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQET SPLRDVAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHH AVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGM ENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKT FLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEAL GGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDY SSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRKLFVLR LKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRF HACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYS ILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQ AFLKLTRHRVTVPLLGLSLRTAQTQLSRKLP TTLTALEAAANPALPSDFKTILD	
SEQ ID NO: 75	MSPLWWGFLLSCLGCKILPGAQQFPRVCMTV DSLVNKECCPRLGAESANVCGSQQGRGQCTEV RADTRPWSGPYILRNQDDRELWPRKFFHRTCK CTGNFAGYNGDCKFGWTGPN CERKKPPVIRQ NIHSLSPQEREQFLGALDLAKKR VHPDYVITTQ HWVGLLGPNGTQPQFANCSVYDFVWLHYYS VRDTLLGGFFPWLVVYVYRFVIGLRVWQWEVI SCKLIKRAATTRQP	TRP-2
SEQ ID NO: 76	MGVKASQTGFVVLVLLQCCSAYKLVYYSW SQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISNDH IDTWEWNDVTLYGMLNTLKNRNP NLKTLISVG GWNFGSQRFKSIASNTQSRRTFIKSVPPFLRTHG FDGLDLAWLYPGRRDKQHFTTLIKEMKAEFIKE AQPGKKQLLSAALSAGKVTIDSSYDIAKISQH LDFISIMTYDFHGAWRGTTGHHSPFRGQEDAS PDRFSNTDYAVGYMLRLGAPASKLVMGIPTFG RSFTLASSETGVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAY YEICDFLRGATVHRILGQQVPYATKGNQWVGY DDQESVKSKVQYLKDRQLAGAMVWALDLDLDF QGSFCGQDLRFLPLTNAIKDALAAT	YKL-40
SEQ ID NO: 77	MAQLFPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSD RAFRVRIAGDAPLQGVLGAL TIPCHVHYLRPP PSRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVR VKVNEAYRFRVALPAYPASLTDVSLALSELRPN DSGIYRCEVQHGIDSSDAVEVKVKGVVFLYR EGSARYAFSFGAQEACARIGAHIAATPEQLYAA YLGGEYEQCDAGWLSDQTVRYPIQTPREACYGD MDGFPGVRNYGVVDPDDLVDVYCYAEDLNGE LFLGDPPEKLTLEEARAYCQERGAEIATTGQLY AAWDGGLDHCSPGWLADGSVRYPIVTPSORCG	бревикан

	GGLPGVKTLFLFPNQTGFPNKHSRNFVYCFRDS AQPSAIP EASNPNASPDGLEAIVTVTETLEEL QLPQEATESERGAISIPIMEDGGGGSSTPEDP AEAPRTLLEFETQSMVPTGFSEEEGKALEEEEE KYEDEEEKEEEEEEEVEDEALWAWPSELSSPG PEASLPTEPAAQEESSLQAPARAVLQPGASPLPD GESEASRPPRVHGPPTETLPTPRERNLASPSSTL VEAREVGEATGGPELSGVPRGESEETGSSEGAP SLLPATRAPEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSV QAQPVLPTDSASRGGVAVVPASGDCVPSCHN GGTCLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLRFCN PGWDAFQGACYKHFSTRRSWEEAETQCRMYG AHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEG DFLWSDGVPLL YENWNPQPD SYFLSGENCVV MVWHDQGGWSDVPCNYHLSYTKMGLVSCG PPPELPLAQVFGPRRLRYEVDTVLRYRCREGLA QRNLPLIRCOENGRWEAPQISCVPRRPARALHP EEDPEGRQGRLLGRWKALLIPPSSPMPGP	
SEQ ID NO: 78	MSRPQGLLWLPPLFTPVCVMLNSNVLLWLTA AIKFTLIDSQAQYPVNTNYGKIRGLRTPNEI LGPVEQYLGVPYASPTGERRFQPPEPPSSWTGI RNTTQFAAVCPQHLDERSLLHDMPLIWFTANL DTLMTYVQDQNECLYLNIVPTEDDIHDQNS KKPVMVYIHGGSYMEGTGNMIDGSILASYGNV IVITINYRLGILGFLSTGDQAAKGNYGLLDQIQ LRWIEENVGAFGGDPKRVTFGSGAGASCVSLL TLSHYSEGLFQKAIQSGTALSSWAVNYQPAKY TRILADKVGCMMLDTTDMVECLRNKNYKELIQ QTITPATYHIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGEF LNYDIMLGVNQGEGLKFVDGIVDNEDGVT PND FDFSVSNFVDNLYGYPEGKDTLRETIKFMYTD WADKENPETRRKTLVALFTDHQWVAVATA DLHAQYGSPTYFYAFYHHCQSEMKPSWADSAH GDEVYVYVFGIPMIGPTELFSCNFSKNDVMSAV VMTYWTNFAKTGDPNQVPQDTKFIHTKPNRF EEVAWSKYNPKDQLYLHIGLKPRVRDHYRATK VAFWLELVPHLHNLNEIFQYVSTTKVPPDMT SFPYGTRRSPAKIWPTTKRPAITPANNPKHSDP HKTGPEDTTVLIETKRDYSTELSVTIAVGASLLF LNILAF AALYYKKDKRRHETHRRRSPQRNTTND IAHIQNEEIMSLQMKQLEHDHECESLQAHDTLR LTCPPDYTLT LRRSPDDIPLMTPNTITMIPNTLTG MQPLHTFNTFSGGQNSTNLPHGHSTTRV	нейроглин 4
SEQ ID NO: 79	MRILKRFLACIQLLCVCRLDWANGYYRQQRKL VEEIGWSYTGALNQKNWGKKYPTCNSPKQSPI NIDEDLTQVNVNLKCLKFQGWKTSLENTFIH NTGKTVEINLTNDYRVSGGVSEMVFKASKITFH WGKCNMSSDGSEHSLEGQKFPLEMQIYCFDAD RFSSFEAAVKGKGLRAL SILFEVGTENLDFK AIIDGVESVSRFGKQAALDPFILLNLLPNSTDKY YIYNGSLTSPPCDTVDWIVFKD TVSISESQLAV FCEVLTMQQSGYVMLMDYLQNNFREQQYKFS RQVFSSYTGKEEIEHAEVCSSEPENVQADPENYT SLLVTWERPRVYDTMIEKFAVLYQLDGEDQ TKHEFLTDGYQDLGAILNLLPNMSYVLQIVAI CTNGLYGKYSQDLIVDMPTDNPELDLFPELIGT EEIIEEEEGKDIEEGAI VNPGRDSATNQIRKKEP QISTTTHYNRIGTKYNEAKTNRSPTRGSEFSGK GDVPNTSLNSTSQPVTKLATEKD ISLTSQTVTEL PPHTVEGTSASLNDGSKTVLRS PHMNLSTGTAES LNTV SITEYEEESLLTSFKLDTGAEDSSGSSPATS	PTPrz1

AIPFISENISQGYIFSENPETITYDVLIPESARNA SEDSTSSGSEESLKDPMEGNVWFPSSTDITAQP DVGSGRESFLQNTYTEIRVDESEKTTKSFSAQP VMSQGPSVTDLEMPHYSTFAFYFTEVTPHAFTP SSRQQDLVSTVNVVYSQTTQPVYNGETPLQPSY SSEVFPLVTPLLLDNQLNTPAASSSDSALHAT PVFPSVDVSFESILSSYDGAPELLPFSSASFSELF RHLHTVSQILPQVTSATESDKVPLHASLPVAGG DLLLEPSLAQYSDVLSTTHAASETLEFGSESGVL YKTLMFQVEPPSSDAMMHARSSGPEPSYALSD NEGSQHIFTVSYSSAIPVHDSVGVTYQGSFSGP SHIPIPKSSLITPTASLLQPTHALSGDGEWGSASS DSEFLLPDTDGLTALNISSPVSVAEFTYTTSVFG DDNKALSKSEIYGNELQIPSFNEMVYPSEST VMPNMYDNVNKLNASLQETSISISSTKGMFPG SLAHTTTKVFDEHISQVPENNFVQPTHTVSQA SGDTSLKPVLSANSEPASSDPASSEMLSPSTQLL FYETSASFSTEVLQPSFQASDVTLLKTVLPVAV PSDPILVETPKVDKISSTMLHLIVSNSASSENML HSTSVPVFVDVSPSHMHSASLQGLTISYASEKY EPVLLKSESSHQVVPVSLYSNDELFTANLEINQ AHPPKGRHVFAFVLSIDEPLNLTINKLIHSDEIL TSTKSSVTGKVFAGIPTVASDTFVSTDHVSPIGN GHVAITA VSPHRDGSVTSTKLLFPSKATSELSHS AKSDAGLVGGGEDGDTDDDGDGDDDDDRGSDG LSIHKCMSCSSYRESQEKVMNDSDTHENSLMD QNNPISYLSSENSEEDNRVTSVSSDSQTGMDRS PGKSPSANGLSQKHNDGKEENDIQTSALLPLS PESKAWAVLTSDEESGSGQGTSDSLNENETSTD FSFADTNEKDADGILAAGDSEITPGFPQSPTSSV TSENSEVFHVSEAEASNSHESRIGLAEGLESEK KAVIPLVIVSALTFICLVVLVILYWRKCFQTA HFYLEDSTSPRVISTPPTPIFP	
ISDDVGAIPKHFPHKADLHASSGFTEEFETLK EFYQEVQSCTVDLGITADSSNHPDNKHKNRYIN IVAYDHSRVLKLAQLAEKDGLTDYINANYVDG YNRPKAYIAAQGPLKSTAEDFWRMIWEHNVEV IVMITNLVEKGRRKCDQYWPADGSEEYGNFLV TQKSVQVLAYYTVRNFTLRNTKIKKGSQKGRP SGRVVTQYHYTQWPDGMGVPEYSLPVLTFVRKA AYAKRHAVGPVVVHCSAGVGRGTGTIVLDSML QQIQHEGTVNIFGFLKHRSQRNYLVQTEEQYV FIHDTLVEAILSKEDEVLDSEIHAAYVNALLIPGP AGKTKLEKQFQLLSQSNIQQSDYSAALKQCNRE KNRTSSIIIPVERSRVGISSLSGEGTDYINASYMG YYQSNFEIITQHPLLHTIKDFWRMIWDHNAQLV VMIPDGQNMAEDEFVYWPNKDEPINCESFKVT LMAEENKCLSNEEKLIQDFILEATQDDYVLEV RHFQCPKWPNPDSPIKTFELISVIKEEAANRDG PMIVHDEHGGVTAGTFCALTTLMHQLEKENS DVYQVAKMINLMRPGVVFADIEQYQFLYKVLVSL VSTRQEENPSTSLDSNGAALPDGNIAESLESV	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс для профилактики или лечения рака, содержащий:
 - а) проникающий в клетку пептид;
 - б) по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп; и
 - в) по меньшей мере один пептидный агонист TLR,

в котором компоненты а)-в) ковалентно связаны и в котором по меньшей мере один агонист TLR пептида является агонистом TLR2 пептида и/или TLR4 агонистом пептида, где указанный комплекс представляет собой полипептид или белок и компоненты а)-в) располагаются в направлении N-конец → C-конец главной цепи указанного комплекса в следующем порядке:

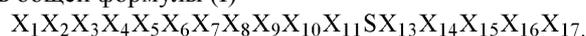
 - (α) компонент а) - компонент б) - компонент в); или
 - (β) компонент в) - компонент а) - компонент б).
2. Комплекс по п.1, где компоненты могут быть связаны с помощью дополнительного компонента, в частности линкера или спейсера.
3. Комплекс по п.1 или 2, где комплекс представляет собой рекомбинантный полипептид или рекомбинантный белок.
4. Комплекс по любому пп.1-3, в котором проникающий в клетку пептид (I) имеет аминокислотную последовательность указанного пептида, состоящую в целом из 5-50 аминокислот, предпочтительно в це-

лом из 10-45 аминокислот, более предпочтительно в целом из 15-45 аминокислот; и/или (II) имеет аминокислотную последовательность, содержащую фрагмент минимального домена ZEBRA, где указанный минимальный домен простирается от остатка 170 до остатка 220 аминокислотной последовательности ZEBRA согласно SEQ ID NO: 3, в которой необязательно 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот заменены, удалены и/или добавлены без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку, или ее вариант.

5. Комплекс по п.4, в котором проникающий в клетку пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую Ser (S) в положении, эквивалентном положению 189 аминокислотной последовательности ZEBRA согласно SEQ ID NO: 3.

6. Комплекс по п.4 или 5, в котором проникающий в клетку пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую:

(I) последовательность общей формулы (I)



в которой 0, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот замены, удалены и/или добавлены без аннулирования указанной способности пептида проникать в клетку, где

X_1 обозначает K, R или H, предпочтительно X_1 обозначает K или R;

X_2 обозначает R, K или H, предпочтительно X_2 обозначает R или K;

X_3 обозначает Y, W или F, предпочтительно X_3 обозначает Y, W или F;

X_4 обозначает K, R или H, предпочтительно X_4 обозначает K или R;

X_5 обозначает N или Q;

X_6 обозначает R, K или H, предпочтительно X_6 обозначает R или K;

X_7 обозначает V, I, M, L, F или A, предпочтительно X_7 обозначает V, I, M или L;

X_8 обозначает A, V, L, I или G, предпочтительно X_8 обозначает A или G;

X_9 обозначает S или T;

X_{10} обозначает R, K или H, предпочтительно X_{10} обозначает R или K;

X_{11} обозначает K, R или H, предпочтительно X_{11} обозначает K или R;

X_{13} обозначает R, K или H, предпочтительно X_{13} обозначает R или K;

X_{14} обозначает A, V, L, I или G, предпочтительно X_{14} обозначает A или G;

X_{15} обозначает K, R или H, предпочтительно X_{15} обозначает K или R;

X_{16} обозначает F, L, V, I, Y, W или M, предпочтительно X_{16} обозначает F, Y или W; и

X_{17} обозначает K, R или H, предпочтительно X_{17} обозначает K или R.

7. Комплекс по п.4 или 5, в котором проникающий в клетку пептид имеет аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4-13, или вариантов последовательностей, у которых не аннулирована способность указанного пептида проникать в клетку, в частности вариантов последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, предпочтительно по меньшей мере 80% идентичностью последовательности и более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку.

8. Комплекс по п.7, в котором проникающий в клетку пептид имеет аминокислотную последовательность, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15) или SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), или вариантов последовательностей, у которых не аннулирована способность указанного пептида проникать в клетку, в частности вариантов последовательностей, характеризующихся по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, предпочтительно по меньшей мере 80% идентичностью последовательности и более предпочтительно по меньшей мере по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, без аннулирования способности указанного пептида проникать в клетку.

9. Комплекс по любому из пп.1-8, в котором по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп выбран из группы, состоящей из: (I) пептида, полипептида или белка, (II) полисахарида, (III) липида, (IV) липопротеина, (V) гликолипида, (VI) нуклеиновой кислоты и (VII) низкомолекулярного лекарственного средства или токсина.

10. Комплекс по любому из пп.1-9, в котором по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп включает или состоит по меньшей мере из одного опухолевого эпитопа.

11. Комплекс по любому из пп.1-10, в котором по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп представляет собой по меньшей мере один CD4⁺-эпитоп и/или по меньшей мере один CD8⁺-эпитоп.

12. Комплекс по любому из пп.1-11, в котором по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп представляет собой пептид, полипептид или белок.

13. Комплекс по любому из пп.1-12, где комплекс содержит более одного антигена или антигенного эпитопа, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более антигенов или антигенных эпитопов.

14. Комплекс по п.13, в котором несколько антигенов или антигенных эпитопов, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более антигенов или антигенных эпитопов располагаются последовательно в комплексе.

15. Комплекс по любому из пп.1-14, в котором по меньшей мере один пептидный агонист TLR содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15 или варианта последовательности, в частности варианта последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью последовательности, предпочтительно по меньшей мере 80% идентичностью последовательности и более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, без аннулирования способности указанного пептида быть агонистом TLR.

16. Комплекс по любому из пп.1-15, где комплекс содержит более одного пептидного агониста TLR, в частности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более пептидных агонистов TLR.

17. Комплекс по любому из пп.1-16, в котором по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп расположен на С-конце проникающего в клетку пептида, при этом проникающий в клетку пептид и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп необязательно связаны с помощью дополнительного компонента, например линкера, спейсера или по меньшей мере одного пептидного агониста TLR.

18. Комплекс по п.17, в котором по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп расположен на С-конце проникающего в клетку пептида, при этом проникающий в клетку пептид и по меньшей мере один антиген или антигенный эпитоп необязательно связаны с помощью дополнительного компонента, например линкера, спейсера, но не с помощью по меньшей мере одного пептидного агониста TLR.

19. Нуклеиновая кислота, кодирующая комплекс по любому из пп.1-18, где комплекс представляет собой полипептид или белок.

20. Вектор для обеспечения экспрессии комплекса по любому пп.1-18, содержащий нуклеиновую кислоту по п.19.

21. Клетка-хозяин для получения комплекса по любому пп.1-18, содержащая вектор по п.20.

22. Способ получения комплекса по любому из пп.1-18, где комплекс представляет собой полипептид или белок, включающий культивирование клетки-хозяина по п.21 в культуральной среде и отделение указанного комплекса от культуральной среды или лизата клетки-хозяина после лизиса клетки-хозяина.

23. Антигенпрезентирующая клетка для профилактики или лечения рака, нагруженная комплексом по любому из пп.1-18.

24. Клетка по п.23, где указанная клетка представляет собой дендритную клетку.

25. Композиция для получения фармацевтической композиции, вакцины или набора для профилактики или лечения рака, содержащая комплекс по любому из пп.1-18.

26. Композиция для получения фармацевтической композиции, вакцины или набора для профилактики или лечения рака, содержащая нуклеиновую кислоту по п.19 или вектор по п.20.

27. Композиция для получения фармацевтической композиции, вакцины или набора для профилактики или лечения рака, содержащая клетку-хозяина по п.21 или клетку, нагруженную комплексом по п.23 или 24.

28. Вакцина, которая является противораковой вакциной, содержащая комплекс по любому из пп.1-18.

29. Вакцина, которая является противораковой вакциной, содержащая нуклеиновую кислоту по п.19 или вектор по п.20.

30. Вакцина, которая является противораковой вакциной, содержащая клетку-хозяина по п.21 или клетку, нагруженную комплексом по п.23 или 24.

31. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения рака, содержащая по меньшей мере один комплекс по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель.

32. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения рака, содержащая по меньшей мере одну клетку по пп.23 и 24 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Фармацевтическая композиция по п.31 или 32, где указанная композиция содержит по меньшей мере два различных комплекса.

34. Применение комплекса по любому из пп.1-18 для профилактики или лечения рака.

35. Применение комплекса по п.34, где рак представляет собой злокачественную неоплазму головного мозга или злокачественную неоплазму лимфоидной, гематопозитической и родственной ткани, наиболее предпочтительно глиобластому.

36. Применение клетки по п.23 или 24 для профилактики или лечения рака.

37. Применение клетки по п.36, где рак представляет собой злокачественную неоплазму головного мозга или злокачественную неоплазму лимфоидной, гематопозитической и родственной ткани, наиболее предпочтительно глиобластому.

38. Набор для профилактики или лечения рака, содержащий комплекс по любому из пп.1-18.

39. Набор для профилактики или лечения рака, содержащий клетку по п.23 или 24.

40. Набор для профилактики или лечения рака, содержащий композицию по пп.25-27, вакцину по пп.28-30 или фармацевтическую композицию по п.31 или 33.

41. Применение набора по пп.38-40 для профилактики или лечения рака.

42. Способ лечения рака или инициации, усиления или удлинения противоопухолевого ответа у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение индивидууму комплекса по пп.1-18.

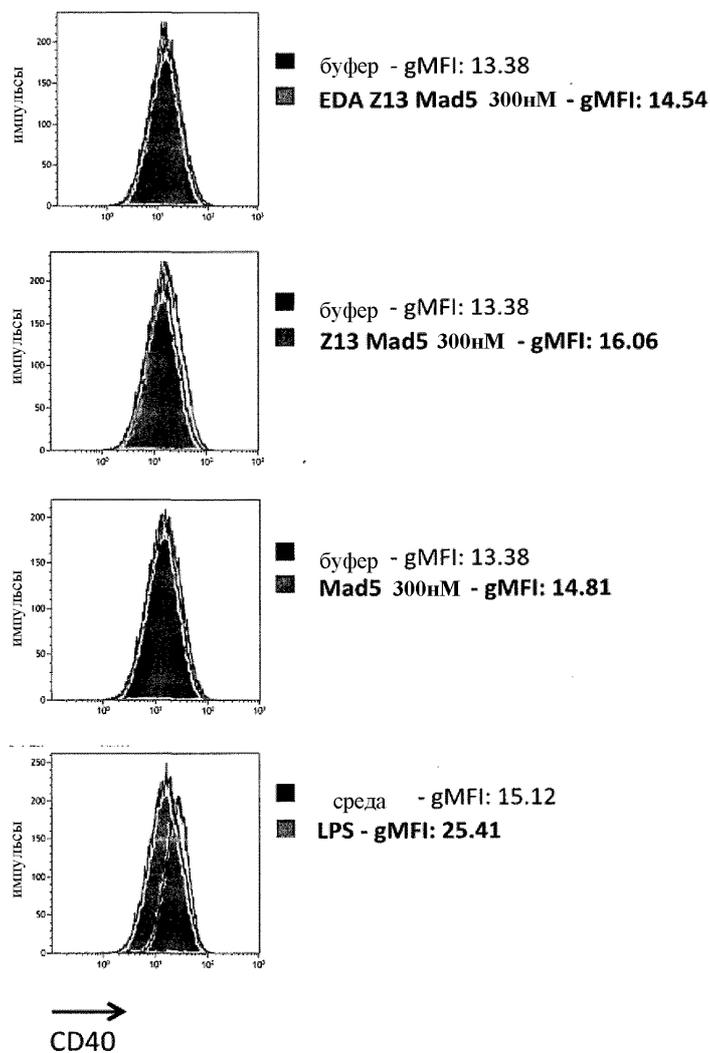
43. Способ по п.42, в котором указанный комплекс содержится в составе композиции по п.25, вак-

цины по п.28 или фармацевтической композиции по п.31 или 33.

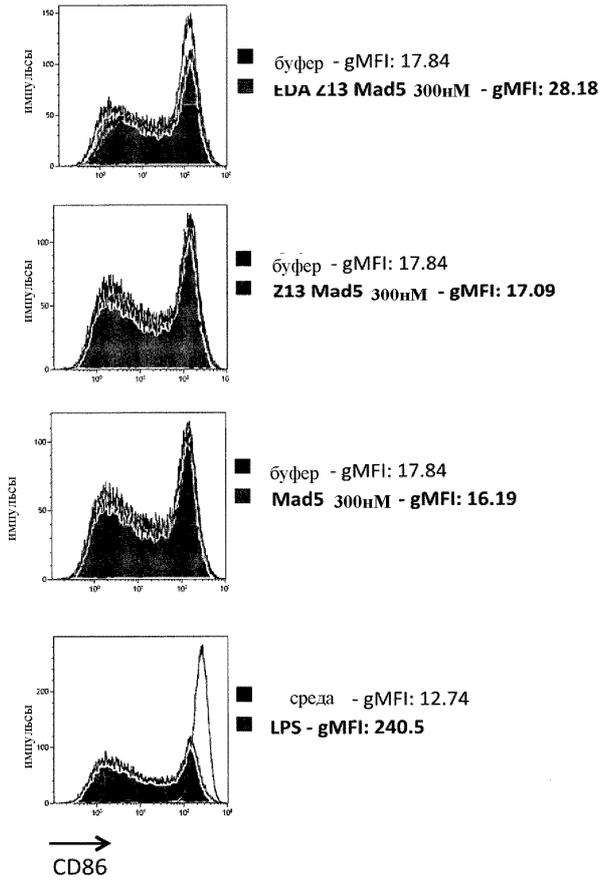
44. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму комплекса по любому пп.1-18.

45. Способ по п.44, где рак представляет собой злокачественную неоплазму головного мозга или злокачественной неоплазу лимфоидной, гемопоэтической и родственной ткани, наиболее предпочтительно глиобластому.

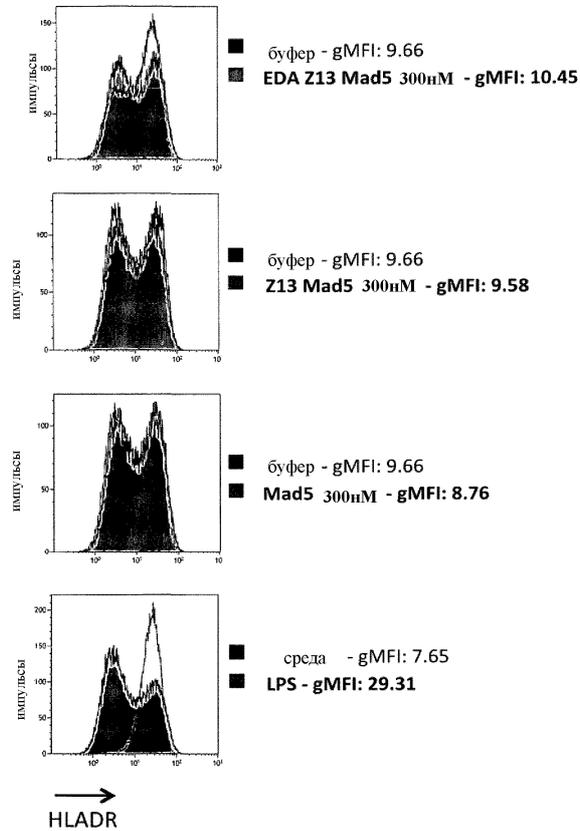
46. Способ по п.44, в котором указанный комплекс содержится в составе композиции по п.25, вакцины по п.28 или фармацевтической композиции по п.31 или 33.



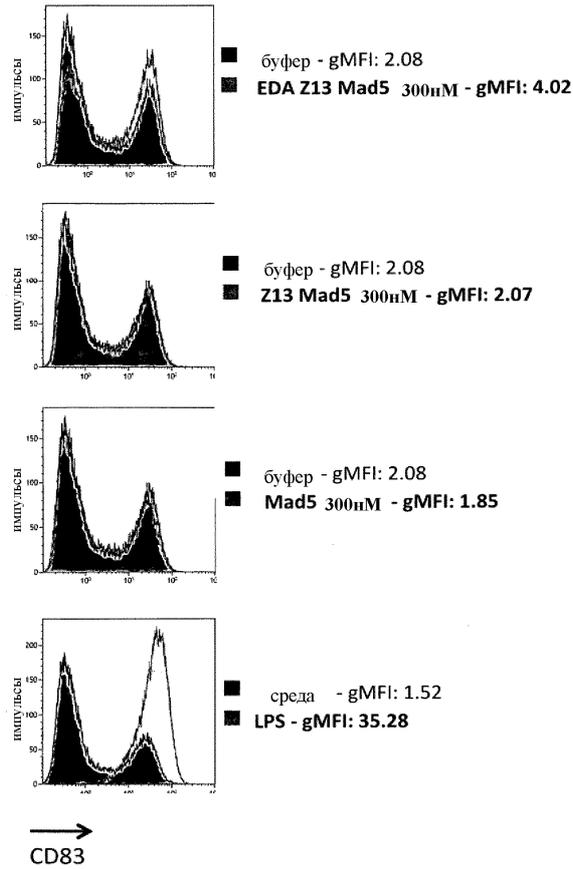
Фиг. 1



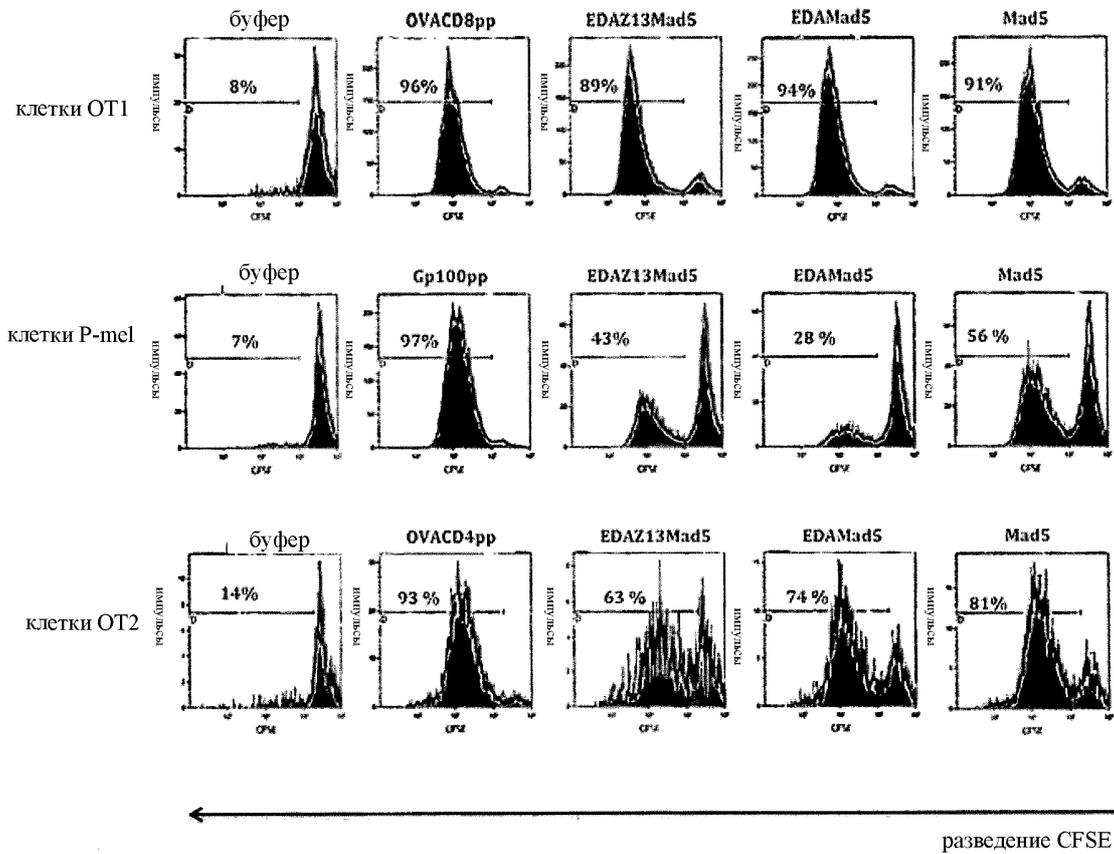
Фиг. 2



Фиг. 3



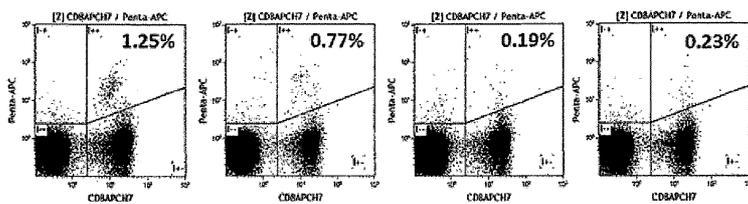
Фиг. 4



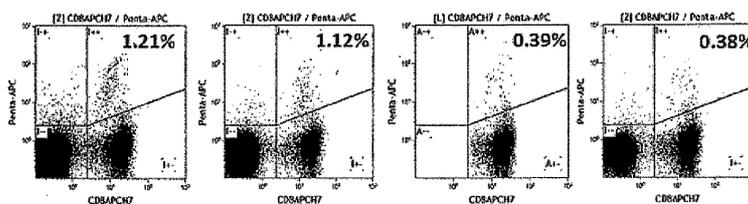
Фиг. 5

Инъекция белка в дозе 2 нмоля

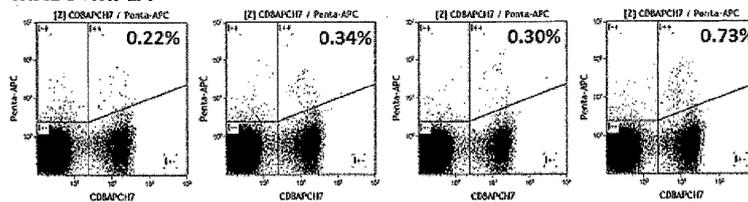
EDA-MAD5



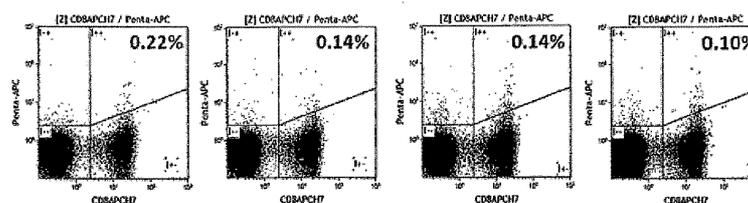
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



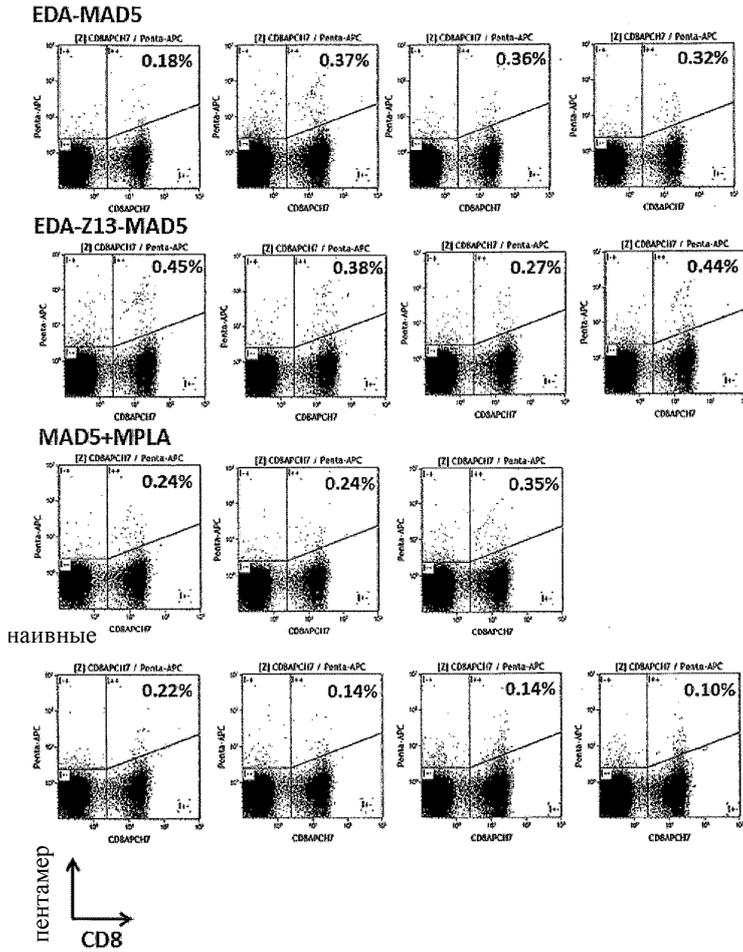
НАИВНЫЕ



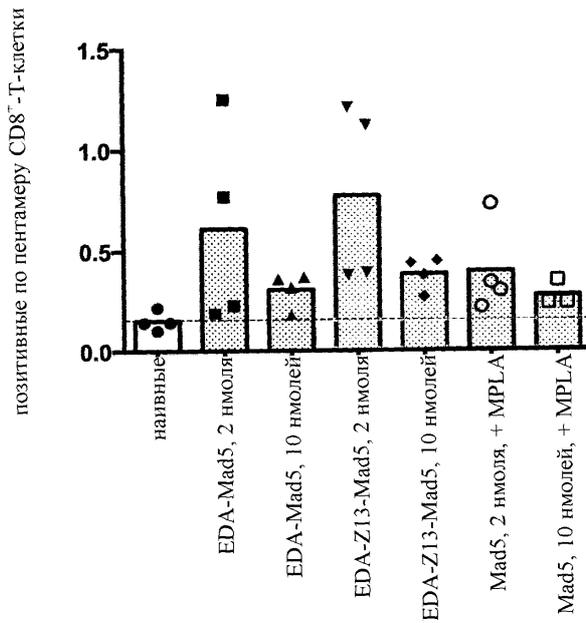
ПЕНТАМЕР
↑
CD8 →

Фиг. 6

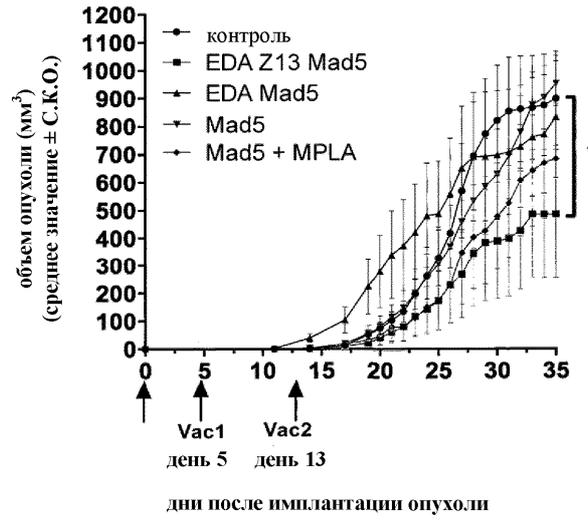
Инъекция белка в дозе 10 нмолей



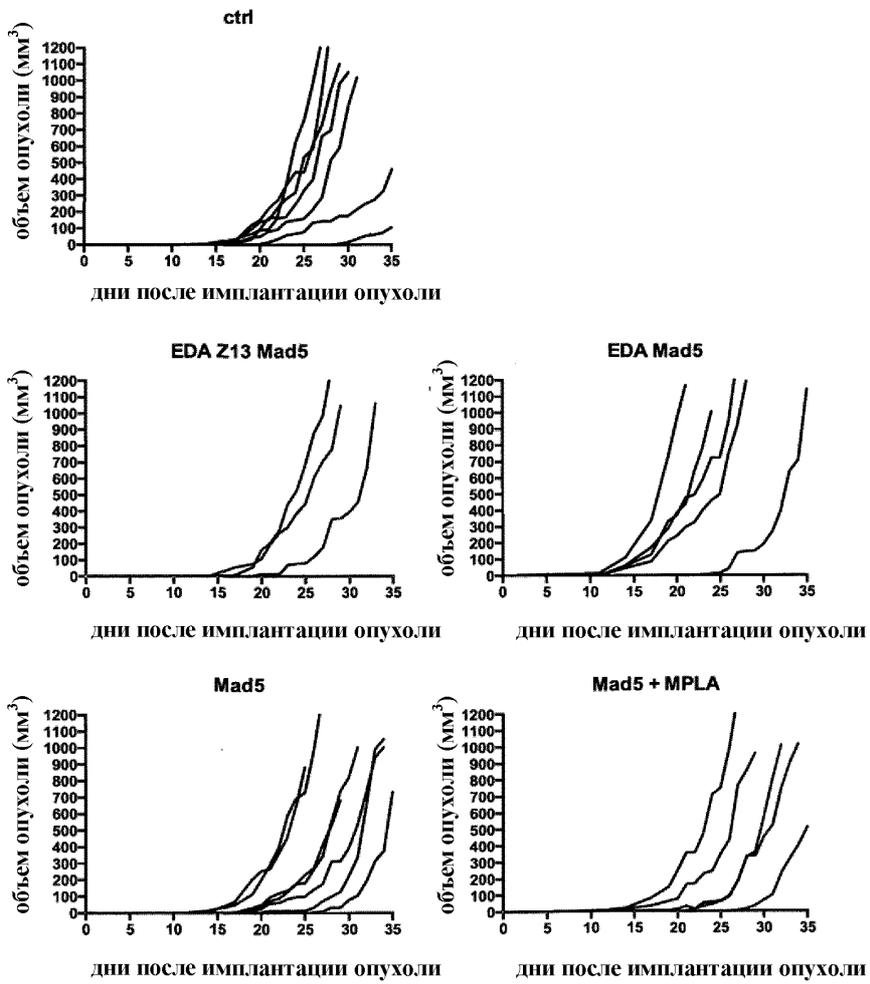
Фиг. 7



Фиг. 8

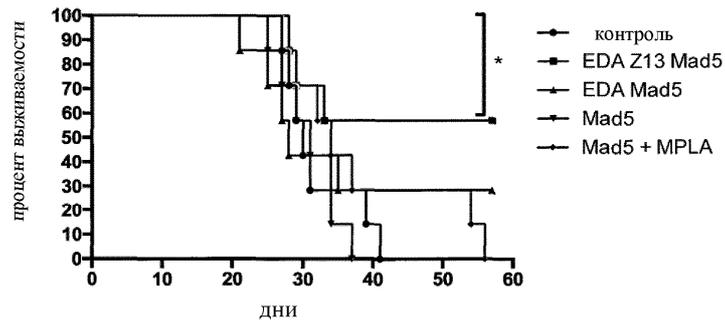


Фиг. 9

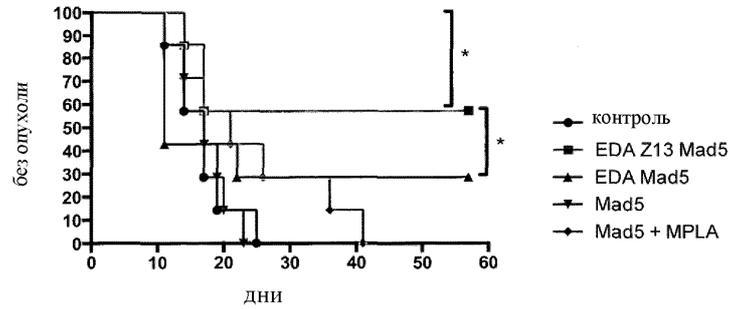


Фиг. 10

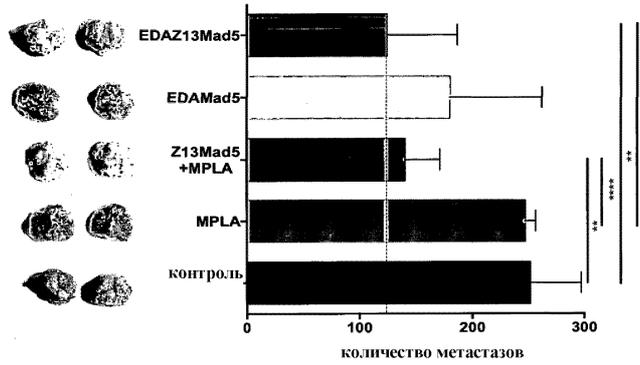
А



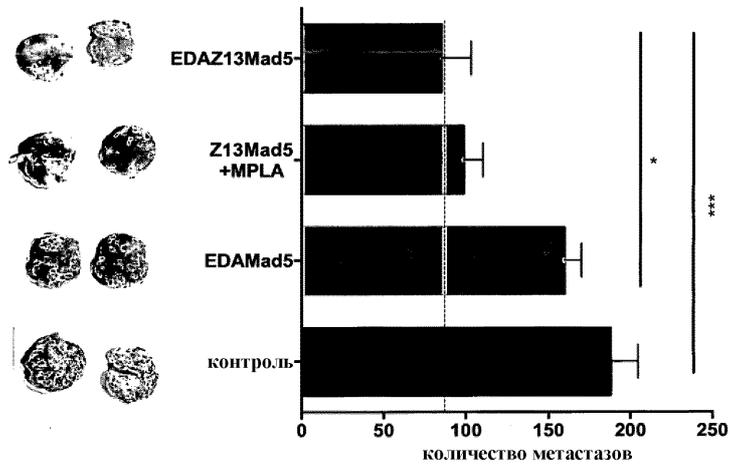
Б



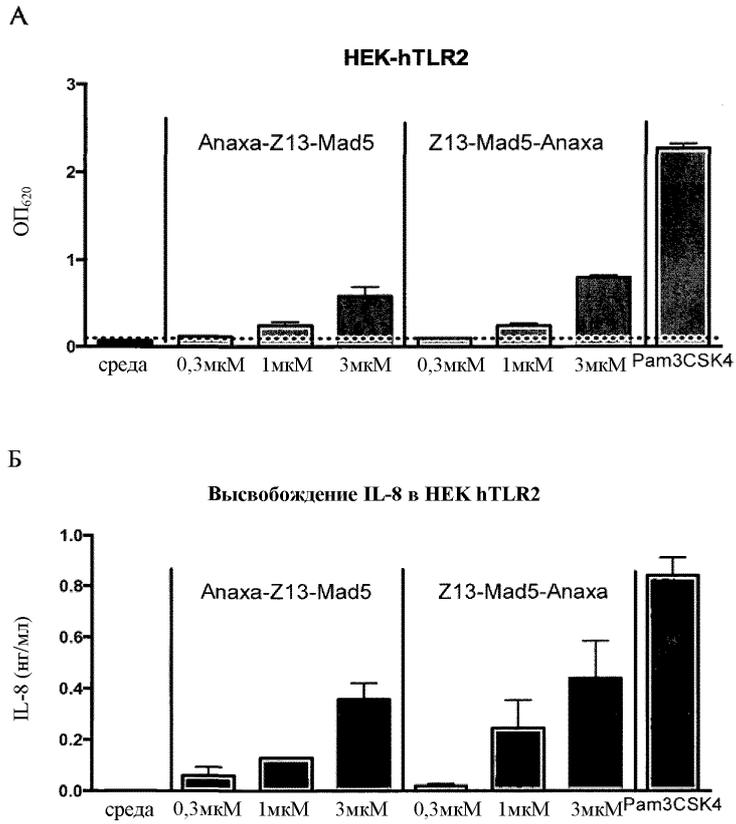
Фиг. 11



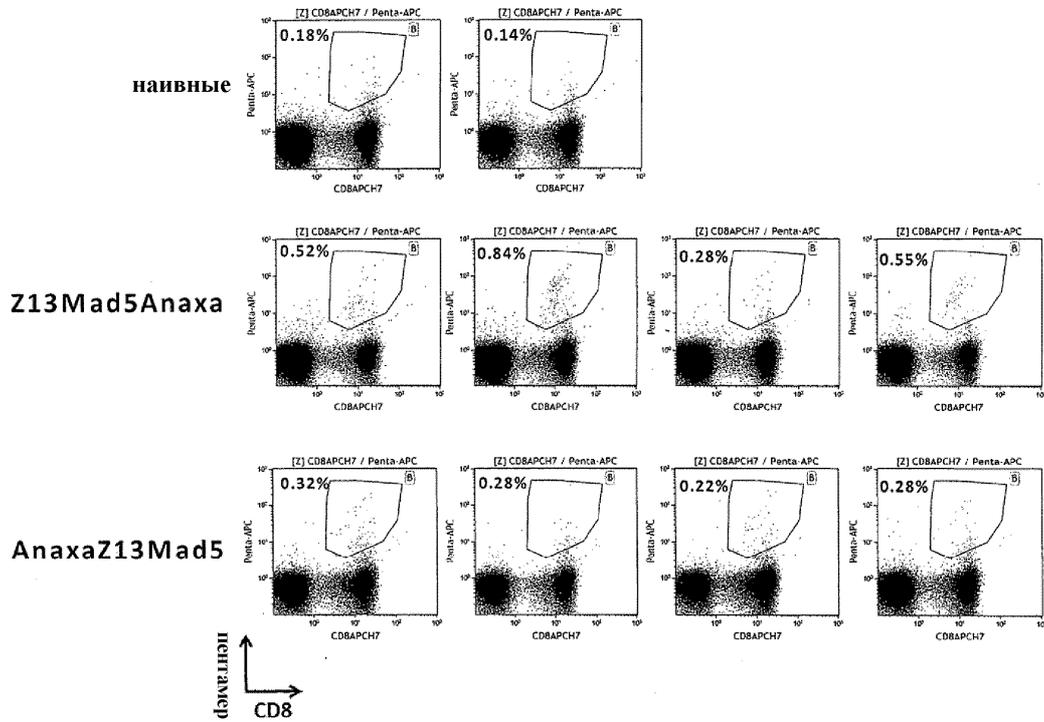
Фиг. 12



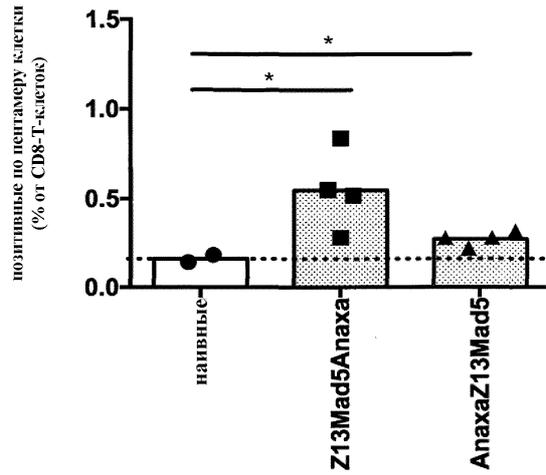
Фиг. 13



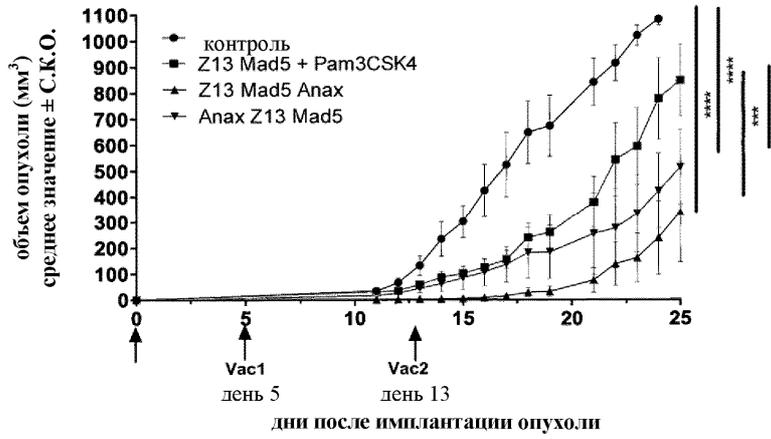
Фиг. 14



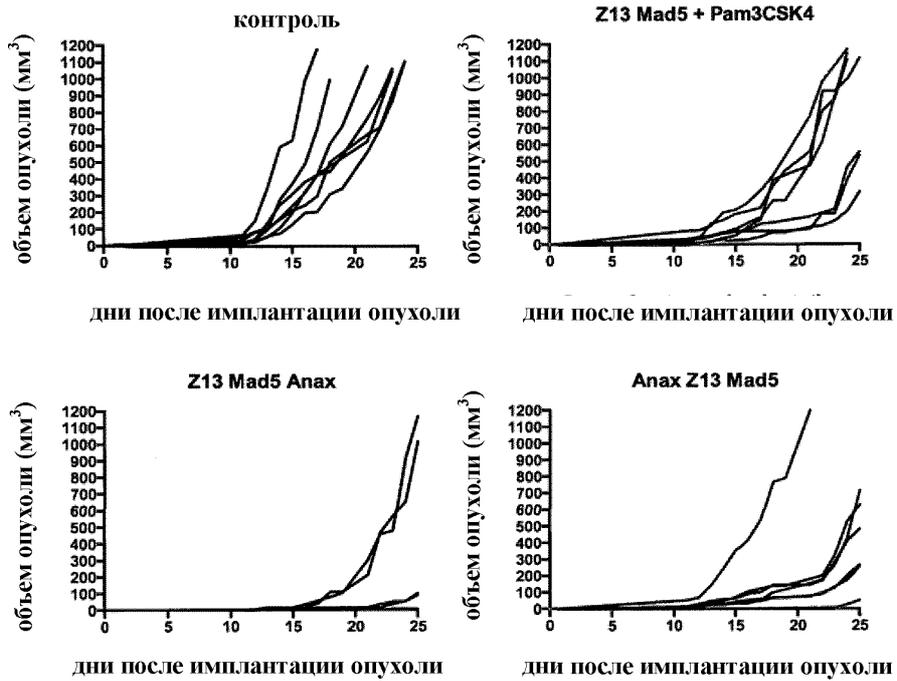
Фиг. 15



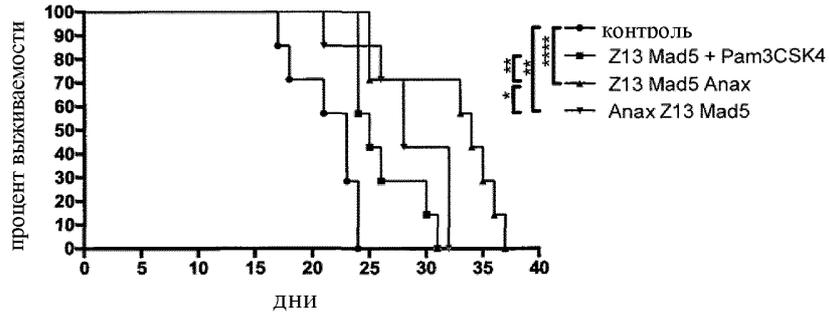
Фиг. 16



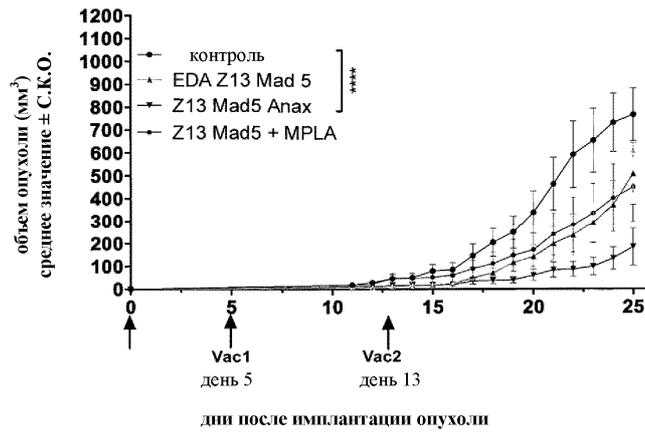
Фиг. 17



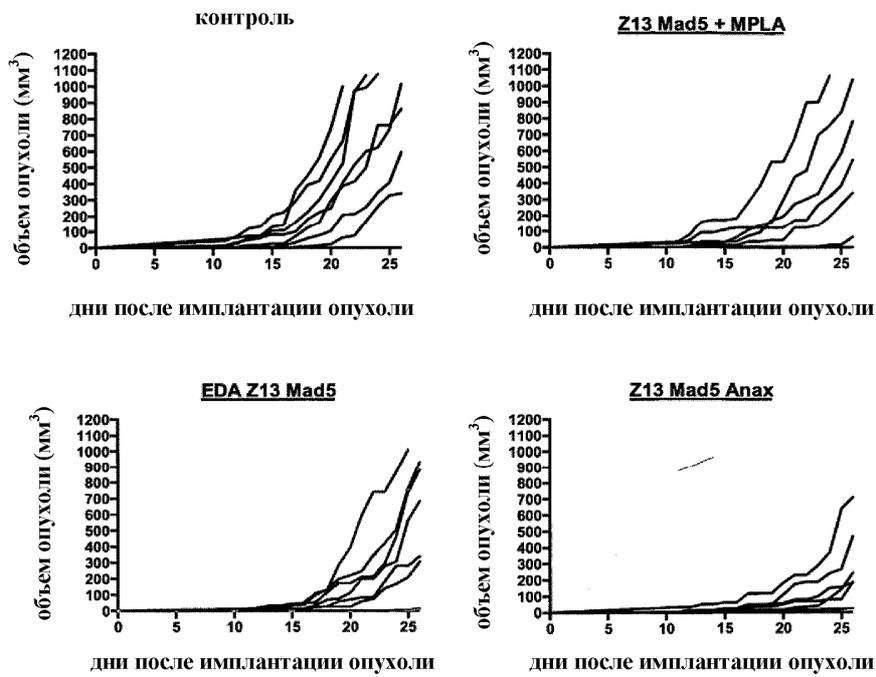
Фиг. 18



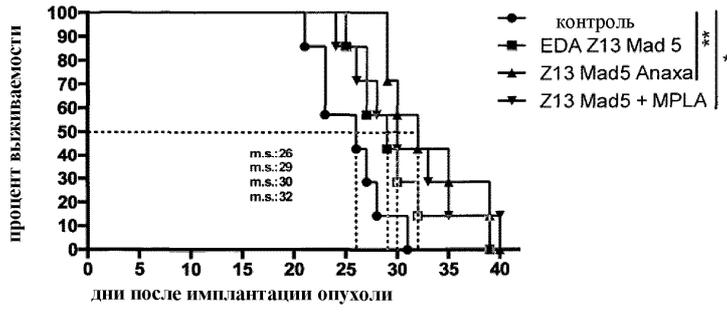
Фиг. 19



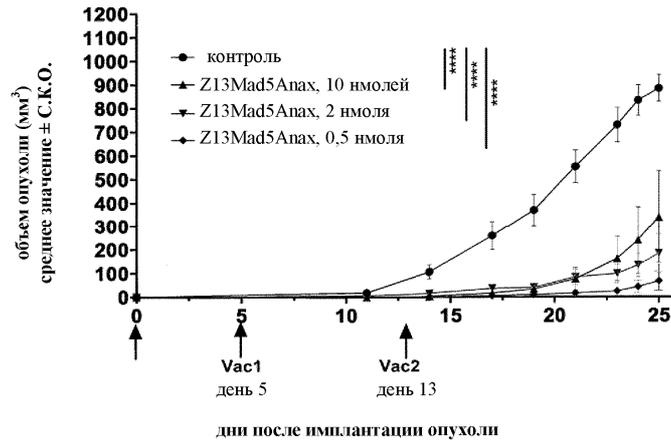
Фиг. 20



Фиг. 21



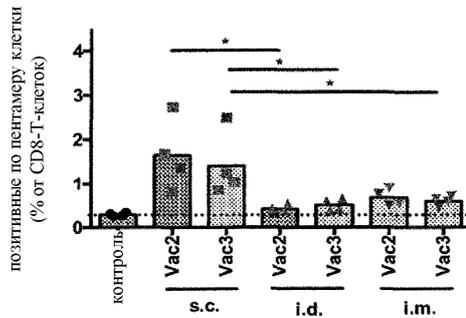
Фиг. 22



Фиг. 23

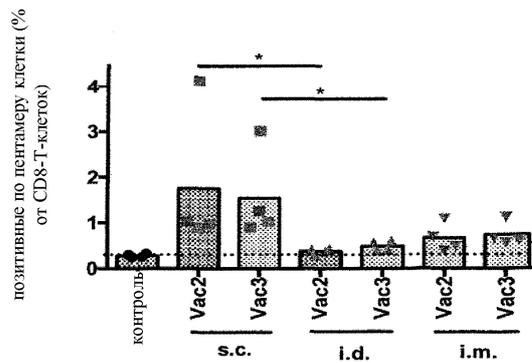
А

0,5 нмоля



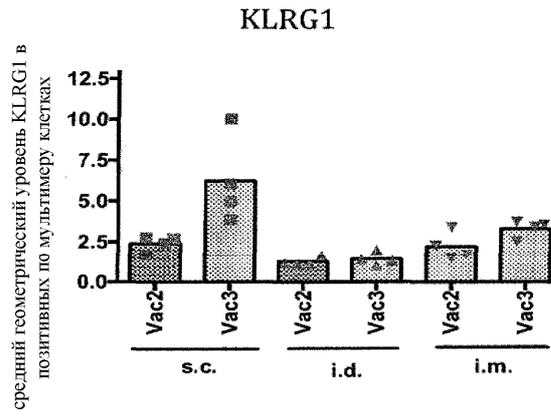
Б

2 нмоля

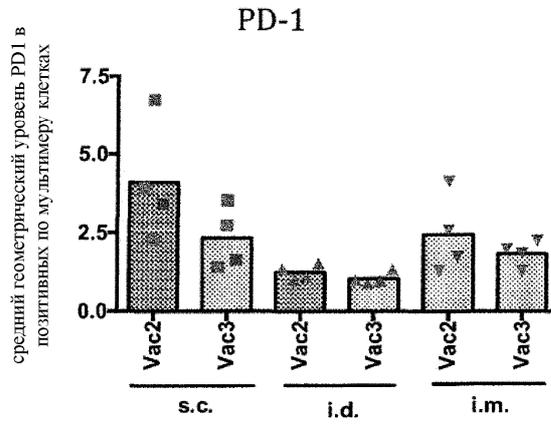


Фиг. 24

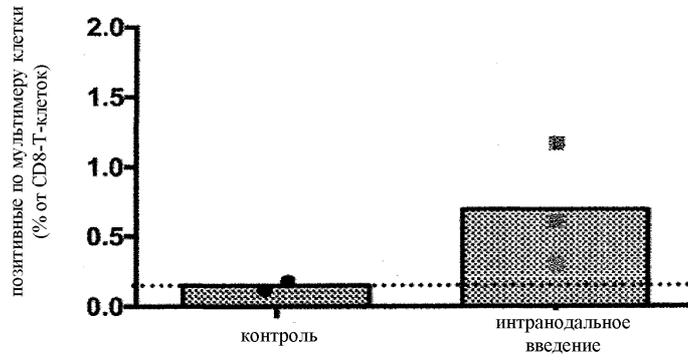
А



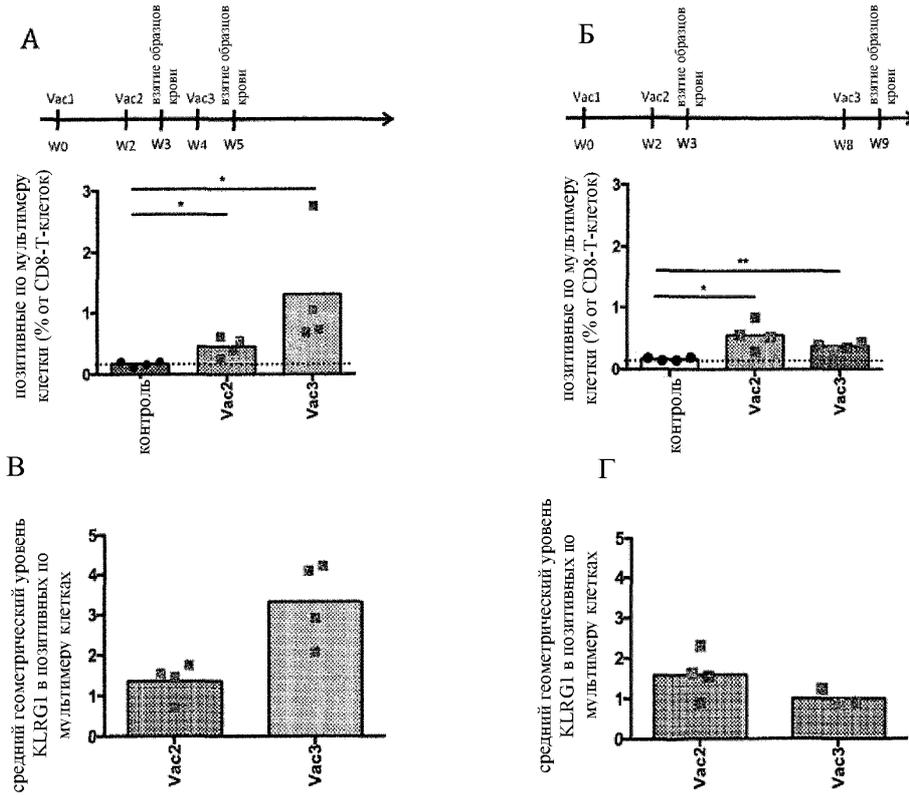
Б



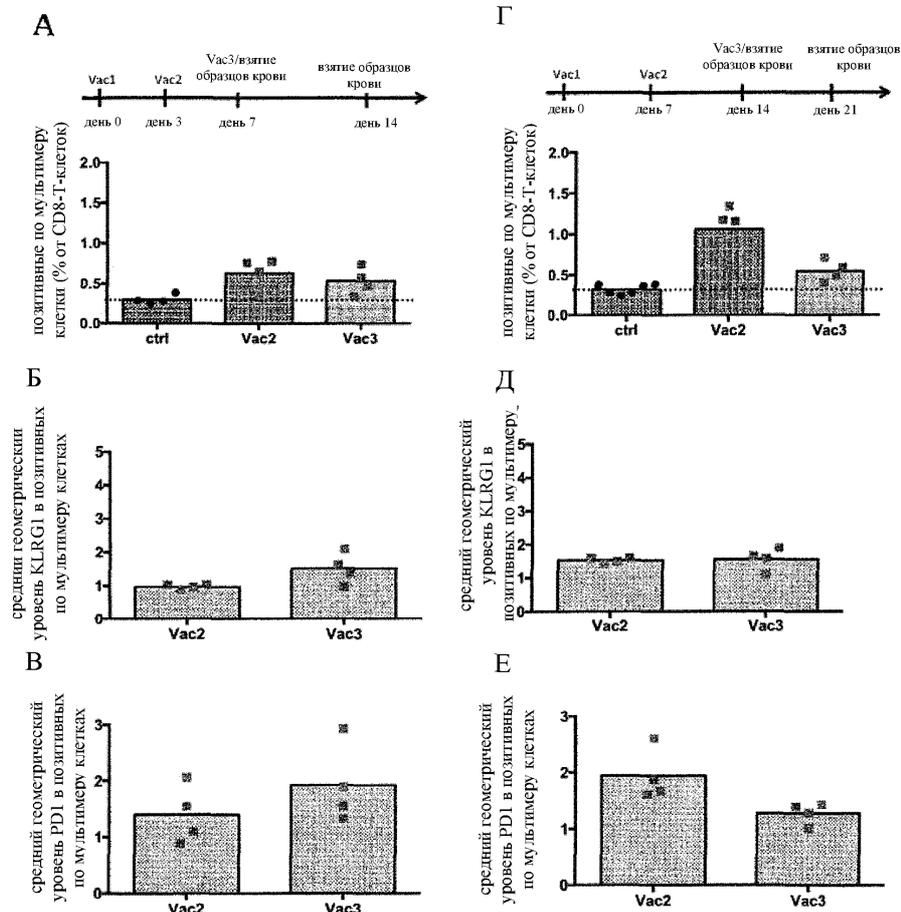
Фиг. 25



Фиг. 26

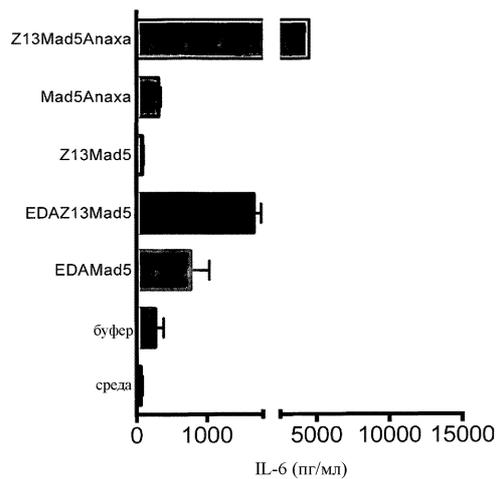


Фиг. 27

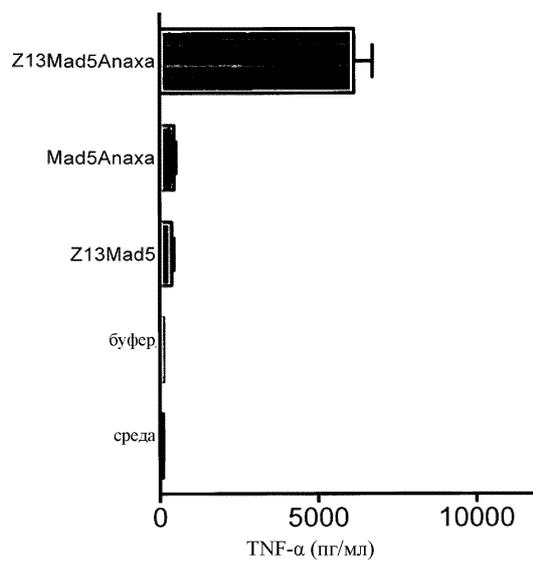


Фиг. 28

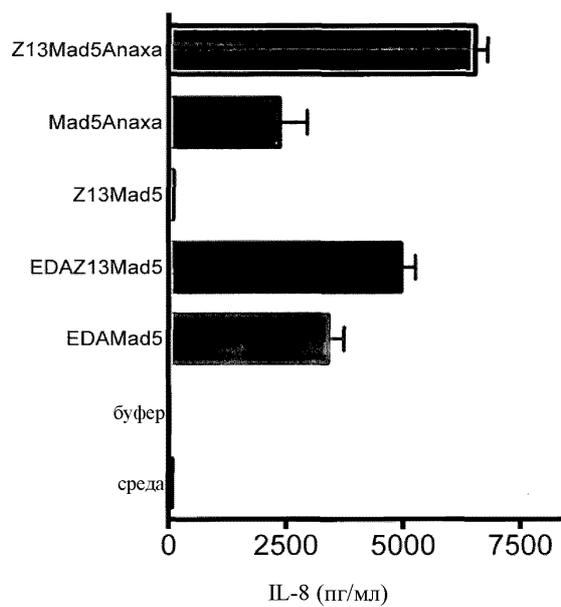
038049



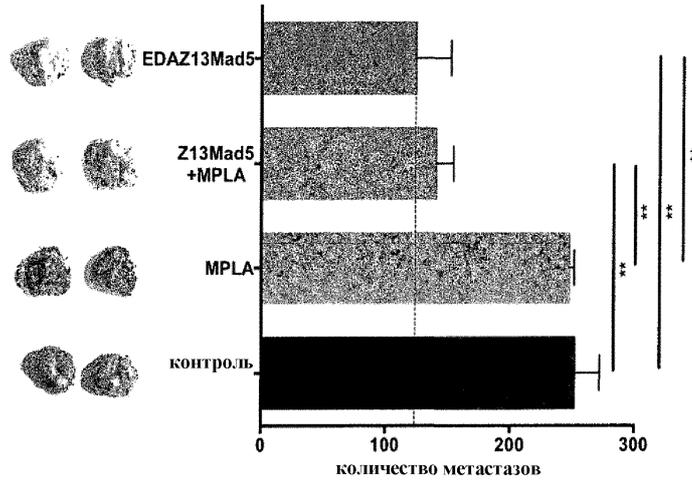
Фиг. 29



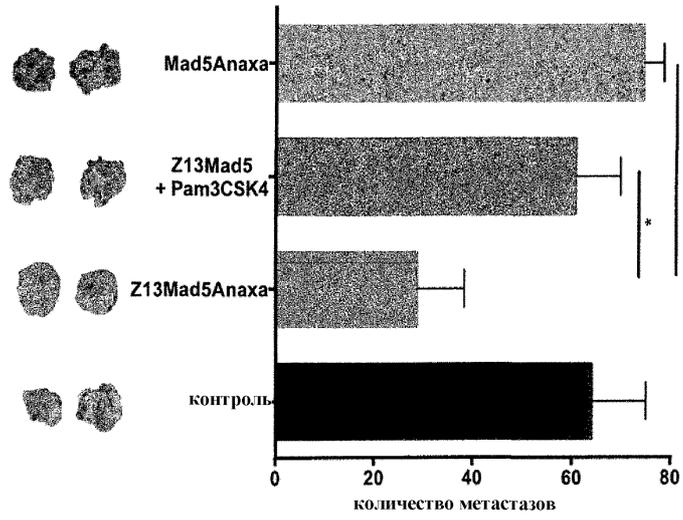
Фиг. 30



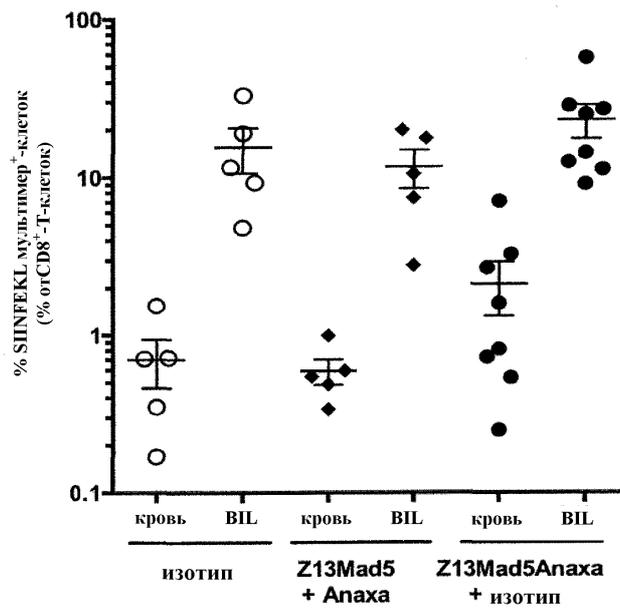
Фиг. 31



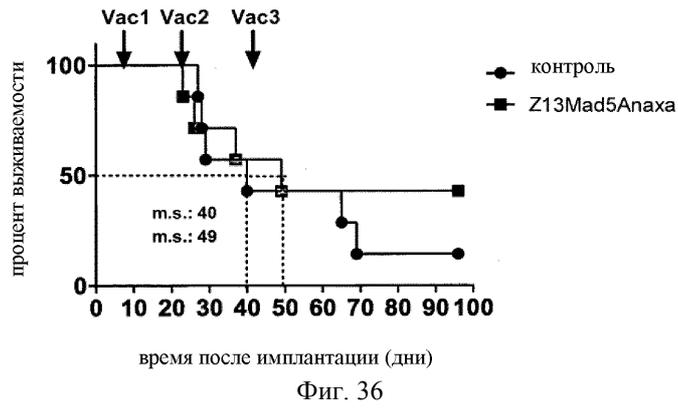
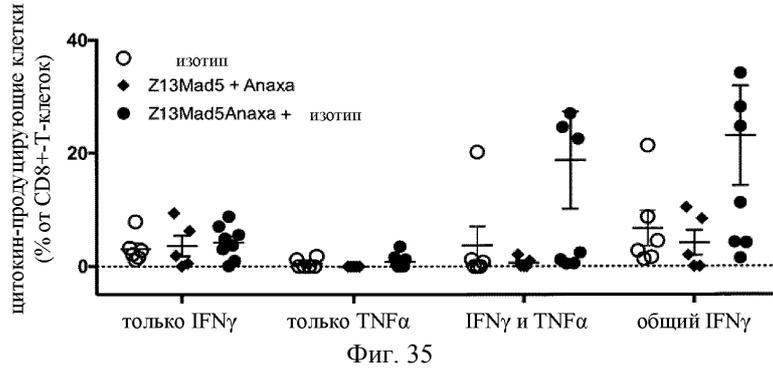
Фиг. 32



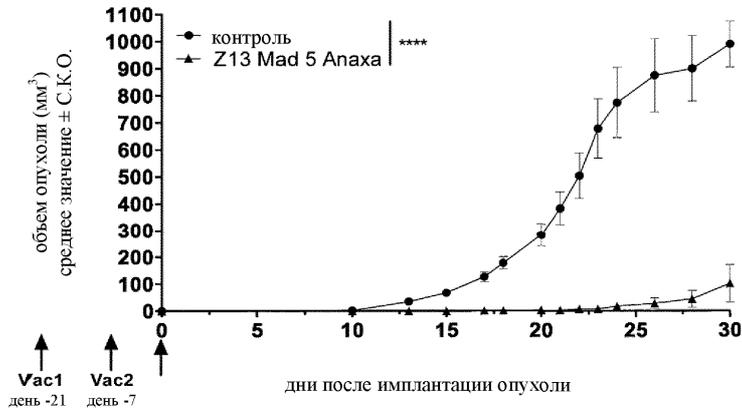
Фиг. 33



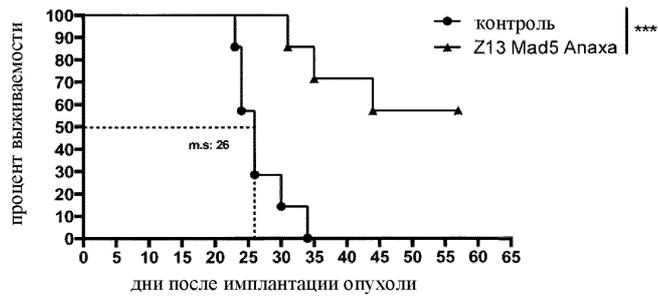
Фиг. 34



А

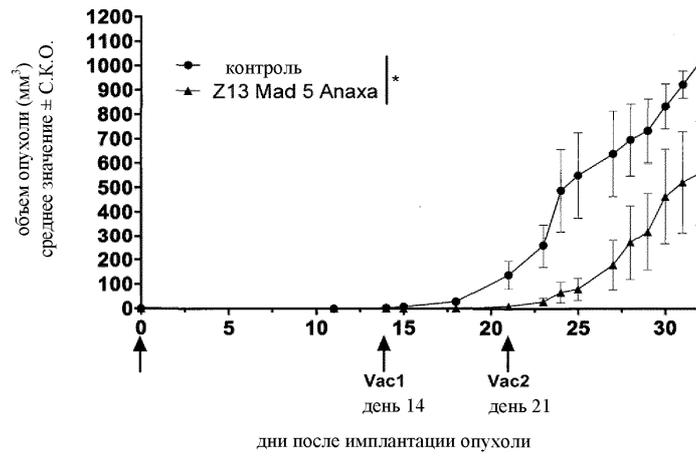


Б

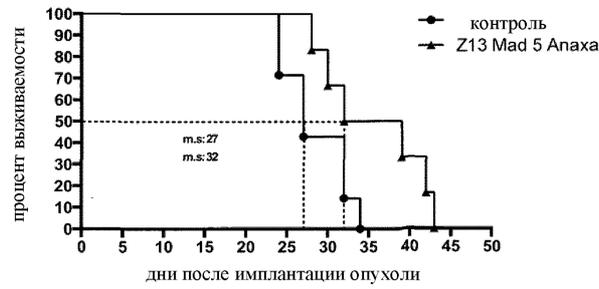


Фиг. 37

А

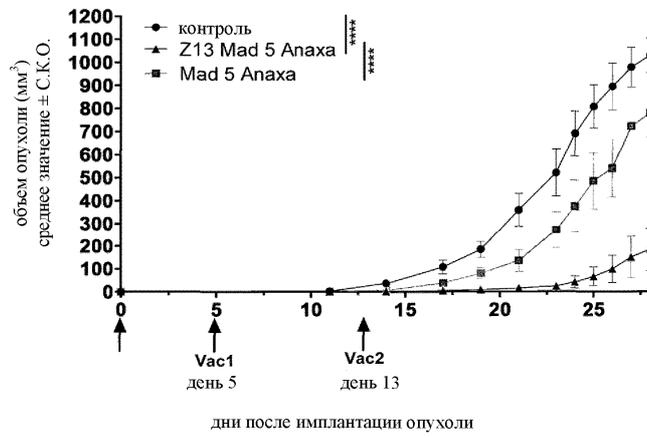


Б

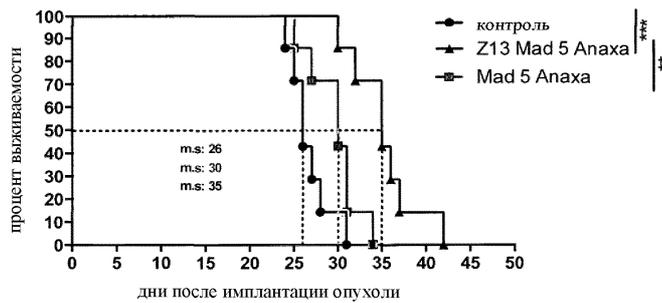


Фиг. 38

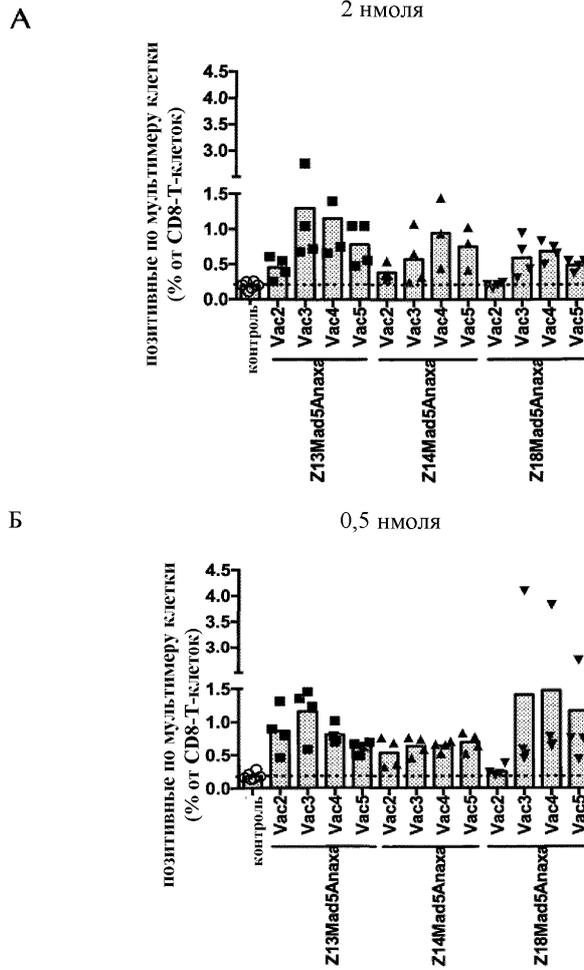
А



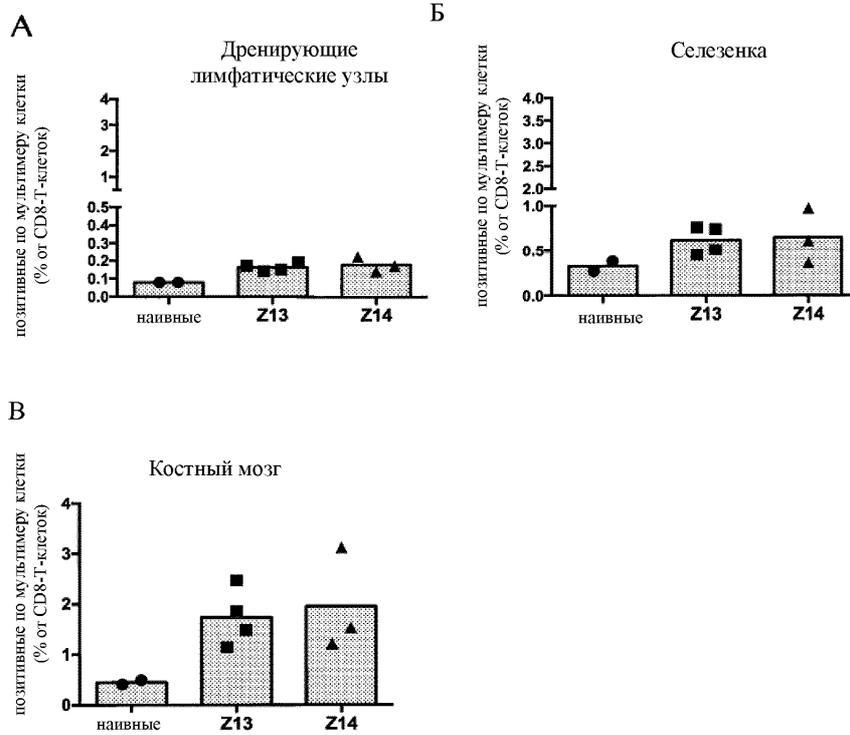
Б



Фиг. 39

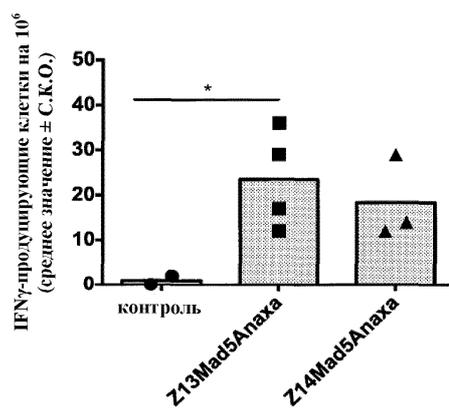


Фиг. 40

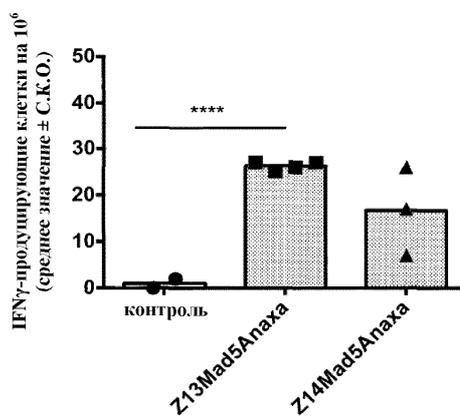


Фиг. 41

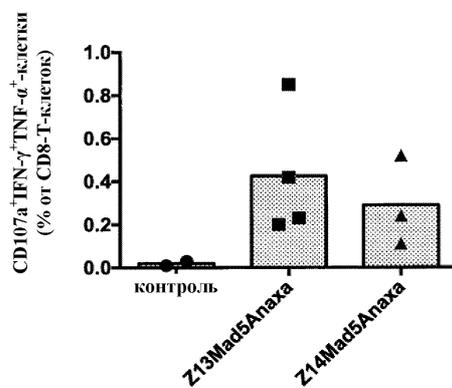
А



Б

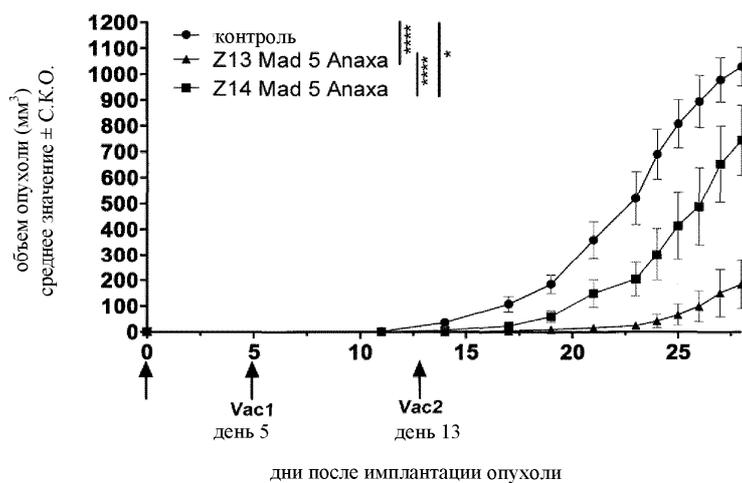


Фиг. 42

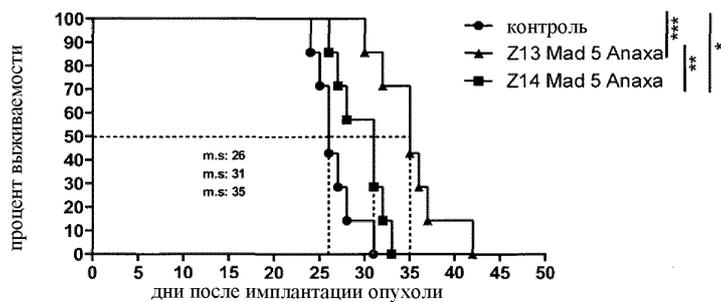


Фиг. 43

А

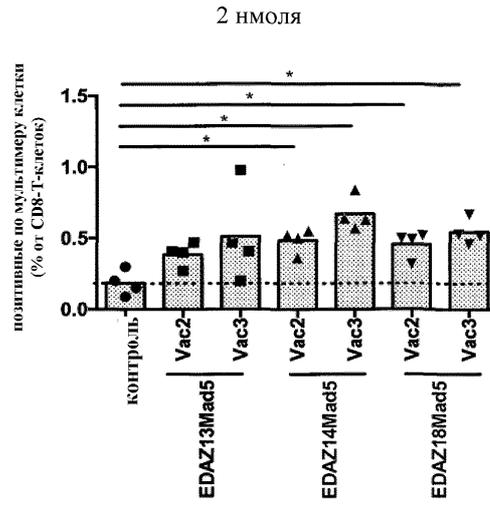


Б

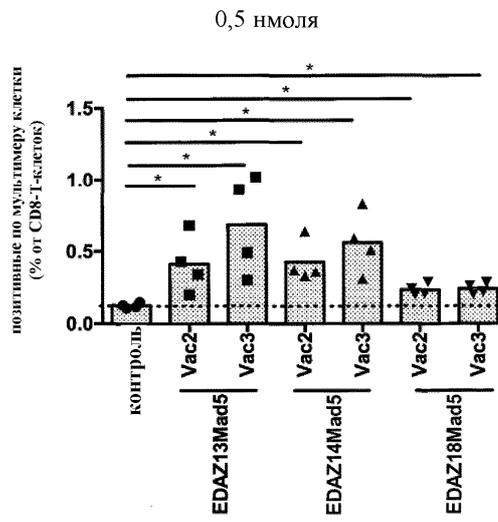


Фиг. 44

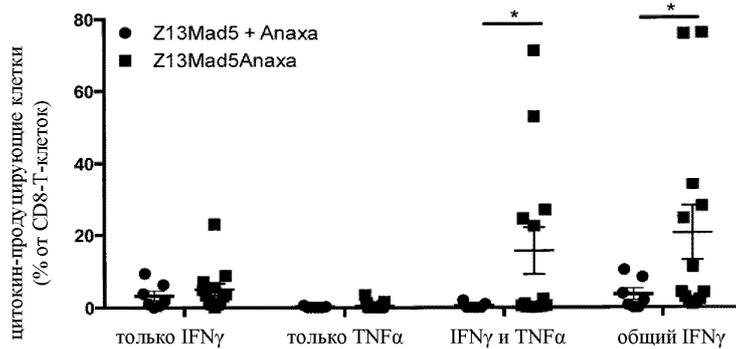
А



Б

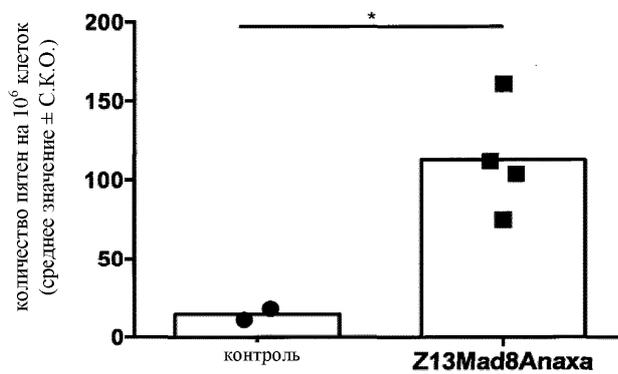


Фиг. 45

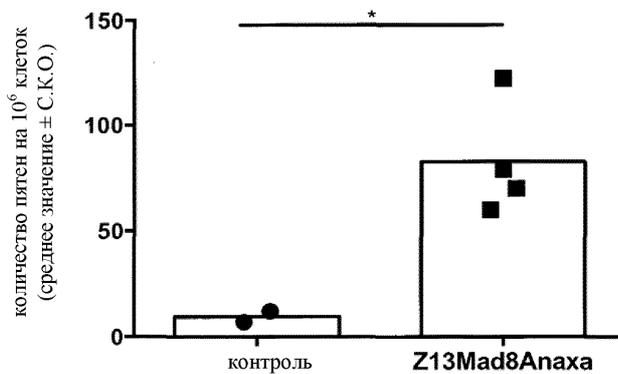


Фиг. 48

А

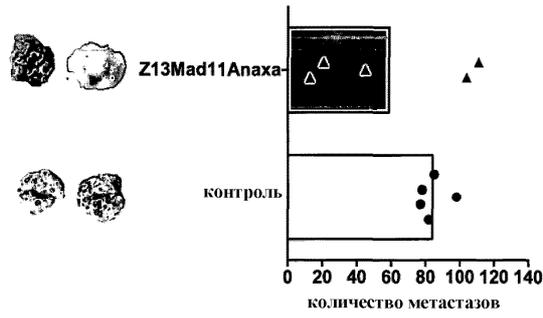


Б

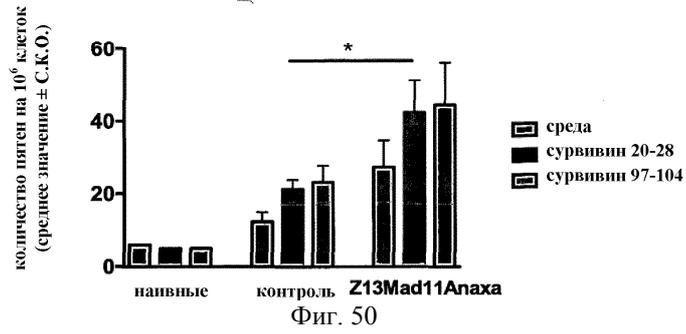


Фиг. 49

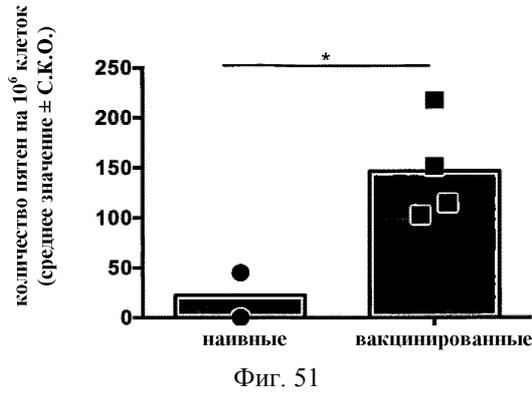
A



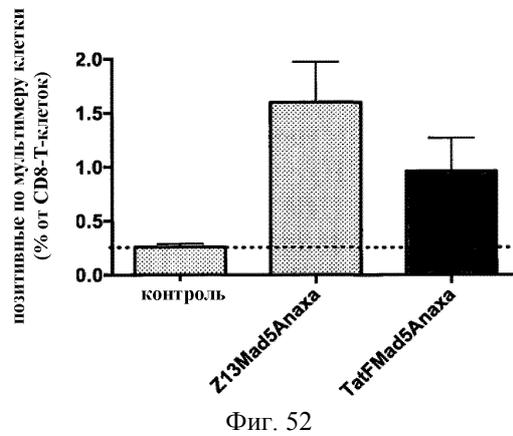
Б



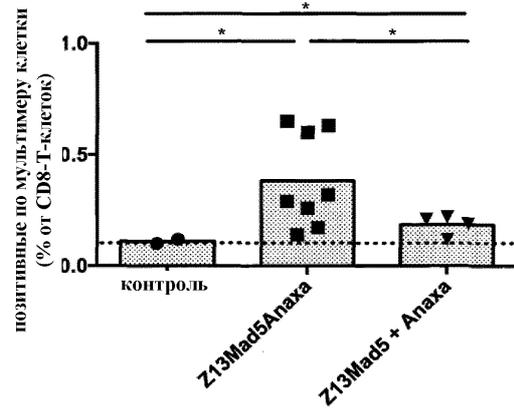
Фиг. 50



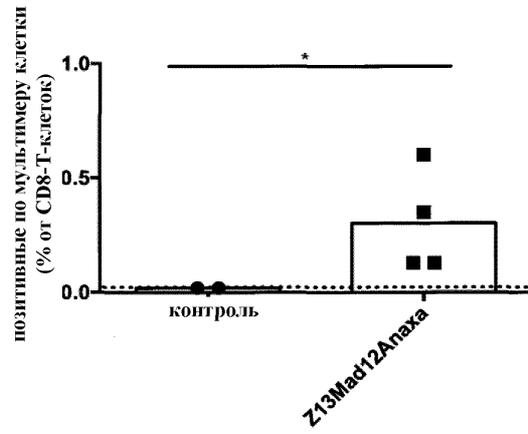
Фиг. 51



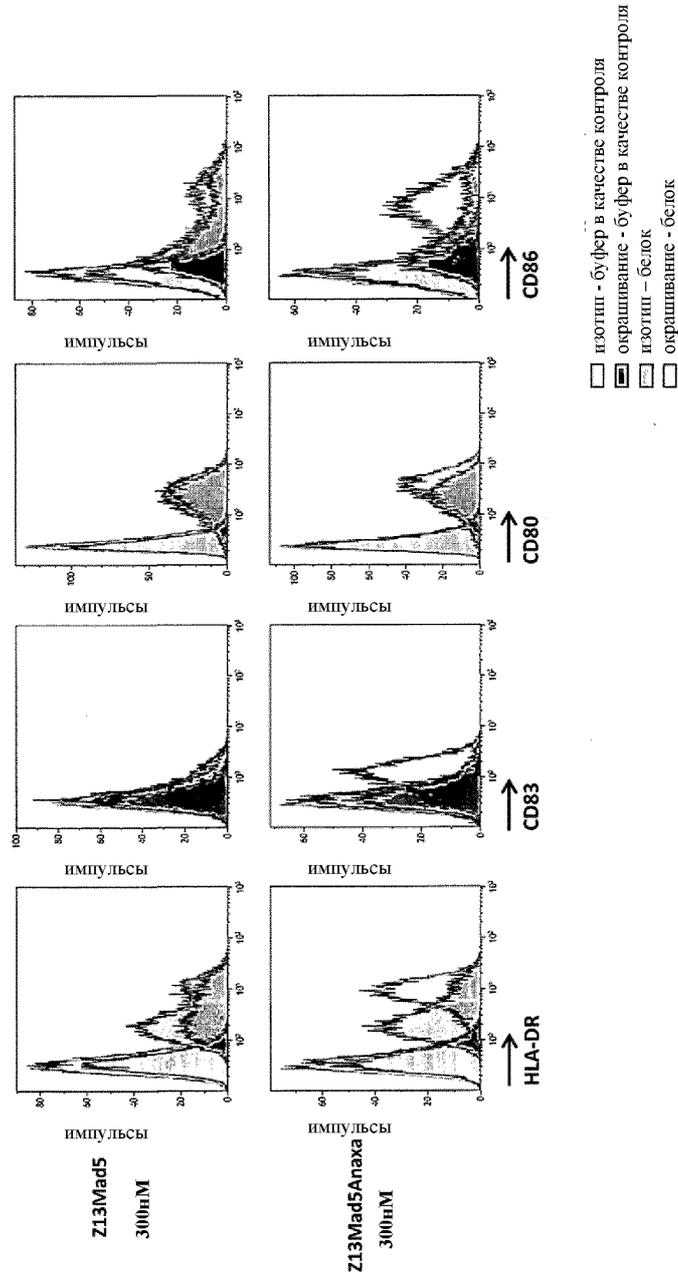
Фиг. 52



Фиг. 53



Фиг. 54



Фиг. 55