

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092200 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.12

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.04

(54) ИНДУЦИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ КОМБИНАЦИИ КОМПОЗИЦИЙ ВАКЦИН И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/652,478; 62/652,484

(32) 2018.04.04

(33) US

(86) PCT/US2019/025902

(87) WO 2019/195626 2019.10.10

(71) Заявитель:

АЛТИММУН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

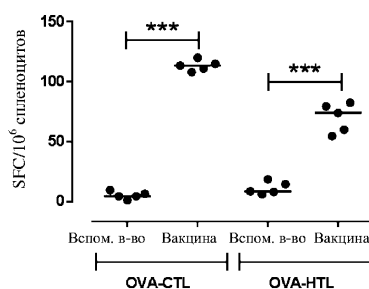
Джорджес Берtrand (GB), Робертс
Скот (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Парамонова
К.В., Лебедев В.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю., Лыу Т.Н. (RU)

(57) В настоящем документе представлены комбинации вакцин и способы усиления индуцированного антигенспецифическими Т-клетками ответа у нуждающегося в этом субъекта. Способы объединяют системную вакцинацию с первой композицией, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; и/или второй композицией с мицеллами, содержащими связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8+ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена для индукции антигенспецифических CD8+ Т-клеток; и, необязательно, третьей композицией, содержащей композицию иммуномодулятора.

(А) Иммуногенность



(В) Общая выживаемость



A1

202092200

202092200

A1

ИНДУЦИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ КОМБИНАЦИИ КОМПОЗИЦИЙ ВАКЦИН И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/652478, поданной 4 апреля 2018 г., и 62/652484, поданной 4 апреля 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

[0002] Настоящая заявка в основном относится к комбинации вакцин, содержащей первичную дозу и/или гетерологичную бустерную дозу и, необязательно, дозу иммунного ингибитора, и способам индуцирования антигенспецифического ответа CD8⁺ Т-клеток.

Предпосылки создания настоящего изобретения

[0003] Вакцины ограничены в своей способности стимулировать устойчивые ответы CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, которые, как известно, играют важную роль в борьбе с заболеваниями, вызванными внутриклеточными патогенами и раком. Единственным исключением является вакцина БЦЖ против туберкулеза, которая, по-видимому, защищает в первую очередь за счет индукции Т-клеток.

[0004] Были предприняты значительные усилия для создания вакцин, индуцирующих Т-клетки, предназначенных для индукции CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток достаточной величины и эффекторной функции, которые непосредственно способствуют удалению инфицированных или опухолевых клеток. Вакцины, в которых используются синтетические пептиды или ДНК в сочетании с системой доставки или рекомбинантными вирусными векторами, представляют особый интерес для индукции клеточно-опосредованного иммунитета, предлагая способность доставлять или экспрессировать антиген внутриклеточно. Однако гомологичная прайм-буст схема введения, в которой первичная доза и бустерная доза антигена/иммуногенов/пептидов презентуется иммунной системе через одни и те же носители и/или векторы доставки, не смогла продемонстрировать значительную клиническую эффективность из-за ограниченной способности к созданию надежного и стойкого противовирусного и противоопухолевого Т-клеточного иммунитета.

[0005] Гетерологичная прайм-буст вакцинация с использованием различных носителей и/или векторов доставки представляет собой многообещающую стратегию по сравнению с гомологичной прайм-буст вакцинацией для индукции Т-клеточного иммунитета из-за: i) уменьшения ответов антител к вирусным векторам, которые, как известно, создают помехи для иммунитета против антигена-мишени за счет клиренса вакцины иммунными комплексами вакцина-антитело; и ii) потенциала различных вакцинных технологий по-разному стимулировать иммунный ответ и работать синергетически. Гетерологичные прайм-буст подходы рассматривают вакцины различных композиций, но в последнее время в основном сосредоточены на комбинациях ДНК/вирусный вектор или вирусный вектор/вирусный вектор для клинической разработки. Учитывая перспективу стимулирования сильного и стойкого Т-клеточного иммунитета, стратегии гетерологичной прайм-буст вакцины представляют особый интерес для лечения острой и хронической вирусной инфекции, рака, аллергии и аутоиммунитета.

[0006] Вакцины против рака или хронической вирусной инфекции представляют собой привлекательный подход для обеспечения высокой специфичности, благоприятного профиля безопасности, готовой применимости и обещания пожизненного противоопухолевого иммунитета по сравнению с другими способами лечения. Несмотря на то, что Т-клеточные вакцины были значительно улучшены, в целом они по-прежнему не обеспечивают какой-либо клинической пользы в качестве монотерапии у пациентов с распространенными формами рака или хроническими вирусными инфекциями.

[0007] В контексте рака и хронической вирусной инфекции иммуносупрессивные механизмы предотвращают или снижают эффекторную активность антигенспецифических Т-клеток, возникающую в результате иммунотерапии вакциной. Эти иммуносупрессивные механизмы могут быть вызваны, прямо или косвенно, супрессивными миелоидными клетками, опухоли-ассоциированными макрофагами, Т-регуляторными клетками и/или ингибирующими рецепторами, экспрессируемыми на Т-клетках. Следовательно, антииммуносупрессор, такой как ингибиторы блокады контрольных точек, ингибиторы супрессивных миелоидных клеток или соединения, участвующие в репрограммировании или реполяризации супрессивных миелоидных клеток, представляет собой класс терапевтических лекарственных средств, которые могут улучшить индукцию и противовирусную или противоопухолевую функцию антигенспецифических Т-клеток, полученных в результате иммунотерапии вакциной. Кроме того, иммуноактиваторы, такие как средства, нацеленные на костимуляторные рецепторы, экспрессируемые Т-клетками, цитокинами или иммуностимуляторами, также могут быть использованы для улучшения

индукции и противовирусной или противоопухолевой функции антигенспецифических Т-клеток в результате иммунотерапии вакциной.

[0008] Таким образом, существует потребность в более надежных композициях вакцин, которые индуцируют клеточно-опосредованные иммунные ответы, особенно в контексте рака и хронических инфекций.

Сущность настоящего изобретения

[0009] В настоящем документе некоторые варианты осуществления предусматривают комбинации вакцин и способы введения гетерологичной прайм-буст схемы дозирования, причем состав вакцины первичной дозы отличается от бустерной дозы при условии, что каждая доза содержит один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток, которые являются одинаковыми. Другими словами, композиции вакцин содержат полипептиды по меньшей мере с одним общим эпитопом CD8⁺ Т-клеток. Настоящие композиции вакцин представляют собой индуцирующие Т-клетки композиции вакцин; вакцины, разработанные для индукции CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток достаточной величины и необходимого фенотипа или эффекторной функции, которые непосредственно способствуют очищению от патогена или опухоли через клеточно-опосредованные эффекторные механизмы, по сравнению только с помощью CD4⁺ Т-клеток В клеткам, приводящие к защитным ответам антител.

[0010] Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрена комбинация вакцин, содержащая а) первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; и b) вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена. Смотрите пример 1. Первая или вторая композиция может представлять собой первичную композицию или бустерную композицию. Согласно определенным вариантам осуществления комбинация вакцин может дополнительно содержать иммуномодулятор, содержащий антииммуносупрессор или иммуноактиватор.

[0011] Согласно вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, вектор альфавируса, вектор вируса герпеса, вектор вируса кори, вектор поксвируса или вектор вируса везикулярного стоматита. Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3.

[0012] Согласно иллюстративным вариантам осуществления комбинацию вакцин применяют в способах индукции иммунного ответа в виде противораковой вакцины или вакцины против хронической инфекции (профилактически или терапевтически). Для противораковых вакцин задача состоит не столько в том, чтобы найти специфические для пациента антигены (хотя это все еще важно), сколько в разработке более иммуногенных способов индукции необходимого иммунного ответа, что требует нарушения иммунологической толерантности к аутоантигенам. Заявители в настоящем документе обеспечивают высокоиммуногенную схему введения, при котором гетерологичная схема введения является синергистом по сравнению с гомологичной схемой введения в модели опухоли на мышах, испытанной в настоящем документе. Смотрите пример 3 и фиг. 1-2.

[0017] Соответственно, в настоящем документе представлены способы индукции иммунного ответа (например, ответа антигена CD8⁺ Т-клеток) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; и введение второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена. Одна из первой композиции или второй композиции вводится в виде первичной дозы, а одна из другой первой композиции или второй композиции вводится в виде бустерной дозы при условии, что вводятся как первая, так и вторая композиции.

[0018] В настоящем документе представленные дополнительные варианты осуществления предусматривают комбинации вакцин и способы введения этих композиций комбинации вакцин, причем комбинация содержит композицию вакцины, индуцирующую Т-клетки, и композицию, содержащую иммунный ингибитор, выбранный из ингибитора иммунной контрольной точки или ингибитора полученных из миелоида супрессорных клеток (MDSC). Композиции вакцин, индуцирующие Т-клетки, представляют собой вакцины, разработанные для индукции CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток достаточной величины и необходимого фенотипа или эффекторной функции, которые непосредственно способствуют очищению от патогена или опухоли через клеточно-опосредованные эффекторные механизмы по сравнению только с помощью CD4⁺ Т-клеток В клеткам, приводящие к защитным ответам антител. Согласно вариантам осуществления композиция вакцины содержит полипептид по меньшей мере с одним эпитопом CD8⁺ Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящая вакцинная композиция,

индуцирующая Т-клетки, содержит либо нереплицирующийся вирусный вектор, либо связанный с фторуглеродом пептид(ы).

[0014] Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрена комбинация вакцин, содержащая первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; или b) вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением из антигена или иммуногена и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8+ Т-клеток антигена или иммуногена; и c) третью композицию, содержащую иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора.

[0015] Согласно вариантам осуществления антииммуносупрессор нацелен на PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD 137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3, GAL1, GAL3, GAL9, ADORA, CD276, VTCN1, IDO1, KIR3DL1, HAVCR2, VISTA, CD244, ADAM17, COX2, PGE-2, iNOS2, PDE5, c-kit, ARG1, PI3K, CSF-1R, каспазу-8, CCL2, RON, ROS или S100A8/A9. Согласно вариантам осуществления антииммуносупрессор представляет собой пембролизумаб (KEYTRUDA), ниволумаб (OPDIVO), цемиплимаб (LIBTAYO), атезолизумаб (TECENTRIQ), авелумаб (BAVENCIO), дурвалумаб (IMFINZI), ипилимумаб (YERVOY), REGN2810, BMS-936558, SHR1210, KN035, IBI308, PDR001, BGB-A317, BCD-100 или JS001.

[0016] Согласно некоторым другим вариантам осуществления антииммуносупрессор представляет собой ингибитор MDSC, нацеленный на PGE-2, COX2, NOS2, ARG1, PI3K, CSF-1R, каспазу-8, CCL2, RON, ROSS100A8/A9 или ядерный рецептор X печени. Согласно вариантам осуществления ингибитор MDSC представляет собой PF-5480090, INCB7839, нитро-аспирин, SC58236, целекоксиб, IPI-549, PLX3397, BLZ945, GW2580, RG7155, IMC-CS4, AMG-820, ARRY-382, силденафил, тадалафил, варденафил, N-гидрокси-нор-L-Arg, иматиниб, z-IETD-FMK, трабектедин, эмриказан, антитело к CCL2 (карлумаб или ABN912), тасквинимод, ASLAN002, IMC-RON8 или GW3965.

[0017] Согласно определенным вариантам осуществления иммуноактиватор нацелен на Toll-подобный рецептор (TLR) 3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, NOD1, NOD2, STING, cGAS, IFR3, рецептор IL-2, рецептор IL12 или рецептор IFN-альфа. Согласно определенным вариантам осуществления иммуноактиваторы представляют собой IMO-2125, SD-101, DV281, ADZ1419, PF-3512676 (AGATOLIMOD), CMP-001, лефитолимод, IC31, MEDI9197, RO6864018, RO7020531, GS-9620, AZD8848, LFX453,

CV8102, мотолимод (VTX-2337), BDB001, HILTONOL, KIN131A, MK-4621 (RGT100), инаригивир (SB9200), MIW815 (ADU-S100), MK-1454, BMS-986301, SB 11285, IL-2, IL-12 или IFN- α .

[0018] Согласно вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, вектор альфавируса, вектор вируса герпеса, вектор вируса кори, вектор поксвируса или вектор вируса везикулярного стоматита. Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3.

[0019] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе представлена комбинация вакцин, которая содержит первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий пептид антигена или иммуногена, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; и третью композицию, содержащую иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора. Согласно некоторым другим вариантам осуществления в настоящем документе представлена композиция вакцин, содержащая вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением из антигена или иммуногена и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток антигена или иммуногена; и третью композицию, содержащую иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора.

[0018] Согласно иллюстративным вариантам осуществления комбинацию вакцин применяют в способах индукции иммунного ответа в виде противораковой вакцины или вакцины от хронической инфекции (профилактически или терапевтически). Заявители в настоящем документе обеспечивают высокоиммуногенный режим дозирования, причем вакцина, индуцирующая Т-клетки, является синергистом с иммуномодулятором, выбранным из ингибитора иммунных контрольных точек или ингибитора супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), по сравнению с иммуномодулятором или одной только композицией вакцины, индуцирующей Т-клетки, в модели опухоли мышей, протестированной в настоящем документе. Смотрите примеры 5 и 7.

[0019] Соответственно, в настоящем документе представлены способы индукции иммунного ответа (например, ответа антигена CD8⁺ Т-клеток) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий пептид антигена или иммуногена, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток, или введение композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с

фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением из антигена или иммуногена и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток антигена или иммуногена; и раздельное введение композиции, содержащей иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора.

Краткое описание графических материалов

[0020] Прилагаемые графические материалы, которые включены в настоящее описание и составляют его часть, иллюстрируют один или более вариантов осуществления настоящего раскрытия и вместе с разделами с подробным описанием и примерами служат для объяснения принципов и реализации настоящего раскрытия.

[0021] На **фиг. 1** показаны кумулятивные ответы IFN- γ ELISpot на четыре пептида, выраженные как количество производящих IFN- γ клеток (пятнообразующих клеток, SFC) на миллион клеток селезенки, рассчитанное для каждой группы на 24 день после введения первичной дозы. Группы 5 (AdGP70 в качестве первичной дозы и PepGP70 в качестве бустерной дозы) и 6 (PepGP70 в качестве первичной дозы и AdGP70 в качестве бустерной дозы) представляют собой группы гетерологичных прайм-буст схем введения, демонстрирующие синергистический эффект по сравнению с гомологичными прайм-буст группами (группы с 1 по 4). Смотрите примеры 1 и 3.

[0022] На **фиг. 2** показан процент CD8⁺ Т-клеток, положительных по окрашиванию декстрамером, на 24 день после введения первичной дозы. Животных в группах с 1 по 4 подвергали гомологичной прайм-буст схеме введения (AdGP70 или PepGP70), а животных в группах 4 и 5 подвергали гетерологичной прайм-буст схеме введения; AdGP70 в качестве первичной дозы и PepGP70 в качестве бустерной дозы (группа 5) или PepGP70 в качестве первичной дозы и AdGP70 в качестве бустерной дозы (группа 6). Смотрите пример 3.

[0023] На **фиг. 3** показаны вакцинные композиции PepGP70 и AdGP70, испытанные по отдельности или в виде прайм-буст комбинаций, синергетических с лечением анти-PD1 в их способности стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, при этом измеряли антигенспецифические CD8⁺ Т-клетки в день 6 (D6) и день 20 (D20). Животным в: группе 1 вводили PepGP70 (в качестве первичной и бустерной дозы) + анти-PD1; группе 2 вводили AdGP70 (в качестве первичной и бустерной дозы) + анти-PD1; группе 3 вводили AdGP70 в качестве первичной дозы и PepGP70 в качестве бустерной дозы + анти-PD1; группе 4 вводили PepGP70 в качестве первичной дозы и AdGP70 в качестве бустерной дозы + анти-PD1; группе 5 вводили только анти-PD1 (контроль) и группа 6 не получала лечения

(контроль). Пептид АН1 представляет собой Т-клеточный эпитоп SPSYVYHQF (SEQ ID NO 72), который присутствует в GP70-472 и GP70-СМ. Смотрите примеры 1, 2 и 5.

[0024] На **фиг. 4А и 4В** показан IFN- γ ELISpot ответ на вакцину FP-OVA по сравнению с группой вспомогательного вещества (фиг. 4А) и противоопухолевая активность с точки зрения общей выживаемости с вакциной FP-OVA по сравнению с вспомогательным веществом против моделей опухоли E.G7-OVA (фиг. 4В). Животных на фиг. 4В индуцировали клетками E.G7-OVA на 24 день, причем ранее введенная композиция вакцины обеспечивала защиту от гибели от роста опухоли. Смотрите пример 6.

[0025] На **фиг. 5А и 5В** показана противоопухолевая активность вакцины FP-OVA (фиг. 5В) по сравнению с вспомогательным веществом (фиг. 5А) в отношении опухолевых моделей E.G7-OVA с точки зрения предотвращения роста опухоли. Животных на фиг. 5В индуцировали клетками E.G7-OVA на 24 день, причем композиция вакцины, ранее введенная в день 0 и день 14, обеспечивала защиту от роста опухоли. Смотрите пример 6.

[0026] На **фиг. 6** показана противоопухолевая активность с точки зрения общей выживаемости после введения вакцины FP-OVA (группы 1 и 2) по сравнению с вспомогательным веществом (группа 3) в отношении моделей опухоли E.G7-OVA, причем животным вводили композиции вакцин после того, как животных индуцировали клетками E.G7-OVA, демонстрирующими терапевтический эффект вакцинной композиции.

[0027] На **фиг. 7** показаны вакцинные композиции РерGP70 или AdGP70, протестированные индивидуально или в комбинации с анти-PD1, синергетические с лечением анти-PD1 в своей способности стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, причем размер опухоли измеряли в течение периода дней. Группа 2 (AdGP70 + анти-PD1) обеспечила 79% животных без опухолей по сравнению с группой 1 (AdGP70) только с 43% животных; группа 4 (РерGP70 + анти-PD1) обеспечила 62% животных без опухолей по сравнению с группой 3 (РерGP70) только с 15% животных. Одно только анти-PD1 обеспечивало только 29% животных без опухолей. Смотрите пример 7.

[0028] На **фиг. 8А и 8В** показана общая выживаемость для каждой группы; аденовирусный вектор GP70 (фиг. 8А) и пептиды GP70, связанные с фторуглеродом (фиг. 8В), с ингибитором иммунной контрольной точки анти-PD1 и без него. Смотрите пример 7.

Подробное описание настоящего изобретения

[0029] *Введение*

[0030] В настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы индукции усиленного ответа Т-клеток. В частности, текущая комбинация вакцин индуцирует опосредованный Т-клетками иммунитет, профилактически или терапевтически, в борьбе с

хроническими вирусными инфекциями и раком. Представленные способы и композиции предусматривают введение гетерологичных первичной дозы вакцины и бустерной дозы, приводящих к индукции Т-клеточного ответа, где «гетерологичный» означает первичную дозу, которая отличается от бустерной дозы, при условии, что обе содержат по меньшей мере один или более тех же эпитопов Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления это означает первичную дозу и бустерную дозу, при которых антиген/иммуногены/пептиды презентуются иммунной системе через различные носители и/или векторы для доставки. Заявители обнаружили, что введение различных вакцин, индуцирующих Т-клетки (например, вирусного вектора, кодирующего антиген, и мицелл, содержащих пептиды, которые содержат общие эпитопы Т-клеток с антигеном, экспрессируемым вирусным вектором), синергетически усиливает индукцию антигенспецифического Т-клеточного ответа. Смотрите пример 3. Согласно вариантам осуществления первичная доза и бустерная доза содержат один или более одинаковых эпитопов CD8⁺ Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления полипептиды первичной дозы и/или бустерной дозы также содержат один или более эпитопов CD4⁺ Т-клеток.

[0031] Последовательность антигена/иммуногена может не быть одинаковой, но должно быть перекрытие по меньшей мере в одном или более Т-клеточных эпитопах (например, один может быть полноразмерным, а другой представлять собой короткий пептид, полученный из полноразмерного антигена, включая в себя химерные пептиды) в первичной и бустерной дозах. Эти Т-клеточные эпитопы могут быть идентифицированы в антигенах или иммуногенах с использованием хорошо известных в настоящей области техники способов, в том числе из опубликованных ссылок, включая в себя базы данных или веб-сайты, которые содержат пептидные последовательности, которые, как известно, связывают молекулы МНС класса I и/или класса II, указанные в опубликованных отчетах (например, веб-сайт SYFPEITHI) или алгоритмы, такие как искусственная нейронная сеть (ANN) или способ стабилизации матриц (SMM) (например, с использованием базы данных иммунных эпитопов и веб-сайта ресурсов анализа). Смотрите пример 1. Согласно вариантам осуществления первичная и бустерная доза содержат один или более общих эпитопов CD8⁺ Т-клеток.

[0032] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе представлены комбинации вакцин, которые содержат первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; и вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с

фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена. Согласно определенным вариантам осуществления первая композиция представляет собой первичную дозу, а вторая композиция представляет собой бустерную дозу. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первая композиция представляет собой бустерную дозу, а вторая композиция представляет собой первичную дозу.

[0033] Используемый в настоящем документе термин «гетерологичная схема введения» означает первичную дозу и бустерную дозу, при которых антиген/иммуногены/пептиды презентуются иммунной системе через различные носители и/или векторы для доставки. Например, в настоящем изобретении первая композиция (в виде первичной дозы или бустерной дозы) содержит антиген или иммуноген на основе вирусного вектора, а вторая композиция (в виде первичной дозы или бустерной дозы) содержит связанные с фторуглеродом пептиды, причем пептид содержит один или более Т-клеточных эпитопов, общих с антигеном или иммуногеном на основе вирусного вектора. Другими словами, согласно определенным вариантам осуществления настоящая комбинация вакцин представляет собой две разные композиции вакцин, индуцирующие Т-клетки, причем каждая композиция индуцирует антигенспецифические CD8⁺ Т-клетки против одного и того же антигена.

[0034] Заявители обнаружили, что гетерологичная схема введения (в которой вводят по меньшей мере одну первичную дозу и по меньшей мере одну бустерную дозу) с антигеном на основе аденовирусного вектора и связанным с фторуглеродом пептидом обеспечивает синергистический эффект индуцированного иммунного ответа по сравнению с гомологичной схемой введения либо с антигеном на основе аденовирусного вектора, либо с фторуглеродным пептидом. Смотрите пример 3 и фиг. 1 и 2. Группы 5 и 6 на фиг. 1 и 2 представляют собой животных, которым вводили гетерологичную схему введения, по сравнению с группами 1-4, которые представляют собой животных, которым вводили гомологичную схему введения. Введение гетерологичных первичной дозы и бустерной дозы индуцирует ответ антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток, как показано на фиг. 1 и 2.

[0035] Согласно определенным вариантам осуществления настоящая комбинация вакцин применяется в качестве терапевтического средства для лечения опухолей и/или профилактики рака. Синергетические эффекты комбинаций вакцин по настоящему изобретению можно применять для лечения определенных опухолей. Смотрите пример 4.

Согласно некоторым другим вариантам осуществления настоящая комбинация вакцин применяется в качестве терапевтического средства для лечения хронических инфекций.

[0036] Согласно определенным вариантам осуществления настоящая комбинация вакцин дополнительно содержит третью композицию, содержащую композицию иммуномодулятора, выбранную из антииммуносупрессора или иммуноактиватора. Определенные белки иммунных контрольных точек, такие как PD1 на Т-клетках и PD-L1 на опухолевых клетках, помогают сдерживать иммунные ответы на эти опухоли, причем, когда PD1 связывается с PD-L1, это взаимодействие препятствует Т-клеткам уничтожать эти опухолевые клетки. Следовательно, блокирование взаимодействия определенных белков иммунных контрольных точек с антииммуносупрессором позволяет Т-клеткам уничтожать опухолевые клетки. Настоящее изобретение объединяет синергистический эффект гетерологичной схемы введения для индукции антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток, таких как к раковому или вирусному антигену, специфическому для типа опухоли или рака (например, меланомы, лимфомы, рака легких и т.д.), с антииммуносупрессором, таким как ингибитор иммунных контрольных точек, который неспецифически сигнализирует Т-клеткам об уничтожении раковых клеток.

[0037] Согласно вариантам осуществления антииммуносупрессор представляет собой ингибитор MDSC. Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) представляют собой гетерогенную группу иммунных клеток, происходящих из миелоидной линии и которые размножаются при определенных патологических состояниях, таких как хроническая инфекция и рак; они также могут играть роль в определенных аутоиммунных заболеваниях. MDSC обладают сильной иммуносупрессивной активностью, а не иммуностимулирующими свойствами, причем они взаимодействуют с Т-клетками и определенными антигенпрезентирующими клетками (APC) для регулирования их функции. MDSC представляют собой известный супрессор Т-клеток (как CD8⁺, так и CD4⁺ Т-клеток) и опосредуют индукцию толерантности при аутоиммунных заболеваниях и раке. Следовательно, ингибиторы активности MDSC могут помочь нарушить толерантность при определенных патологических состояниях. Настоящее изобретение объединяет синергистический эффект гетерологичной схемы введения для индукции антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток, таких как к раковому или вирусному антигену, специфическому для типа опухоли или рака, с ингибитором супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), который помогает нарушить толерантность путем ингибирования толерогенных MDSC и обеспечения более надежного иммунного ответа индуцированными CD8⁺ Т-клетками.

[0038] Заявители обнаружили синергистический эффект настоящей гетерологичной схемы введения в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек, анти-PD1, когда вторая композиция (связанный с фторуглеродом пептид) вводится в качестве первичной дозы, а первая композиция (нереплицирующийся антиген или иммуноген на основе вирусного вектора) вводится в виде бустерной дозы. Смотрите пример 5 и фиг. 3. Согласно определенным вариантам осуществления мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена бустерной дозы и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток бустерной дозы (например, PepGP70), вводят в качестве первичной дозы, а нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток (например, AdGP70), вводят в виде бустерной дозы в сочетании с введением ингибитора иммунных контрольных точек анти-PD1. Пептиды, связанные с фторуглеродом, являются амфифильными и спонтанно образуют мицеллы в определенных растворителях, причем эти мицеллы при введении животному или человеку предпочтительно поглощаются антигенпрезентирующими клетками (APC) для процессинга. Смотрите патенты США № 7687455 и 9119811; описания каждого из них включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0039] Заявители обнаружили, что введение либо первой, либо второй композиции вакцин в сочетании с третьей композицией, ингибитором иммунных контрольных точек, обеспечивает синергетический эффект индуцированного иммунного ответа по сравнению с введением только этих композиций. Смотрите пример 7 и фиг. 7, 8А и 8В. Группы 2 и 4 на фиг. 7 представляют собой животных, которым вводили комбинацию вакцин, по сравнению с группами 1 и 3, которые представляют собой животных, которым вводили одну из двух композиций вакцины, индуцирующих Т-клетки. Введение комбинации вакцин также увеличивало общую выживаемость животных по сравнению с животными, которым вводили однократное лечение, как показано на фиг. 8А и 8В.

[0040] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе представлены комбинации вакцин, которые содержат первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; и третью композицию, содержащую иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора. Согласно некоторым другим вариантам осуществления в настоящем документе представлены комбинации вакцин, которые содержат вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с

фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением из антигена или иммуногена и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток антигена или иммуногена; и третью композицию, содержащую иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора.

[0041] Согласно вариантам осуществления первая композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор, такой как аденовирусный вектор. Из всех доступных вирусных векторов с дефицитом репликации аденовирус является наиболее эффективным в примировании ответов Т-клеток на рекомбинантный антиген. Согласно вариантам осуществления вторая композиция содержит пептид, связанный с фторуглеродом.

[0042] *Определения*

[0043] В настоящем документе единственное число используются, как это обычно бывает в патентных документах, для включения одного или более чем одного, независимо от любых других случаев или использования «по меньшей мере одного» или «одного или более».

[0044] Используемый в настоящем документе термин «или» используется для обозначения неисключительного или, так что «А или В» включает в себя «А, но не В», «В, но не А» и «А и В», если не указано иное.

[0045] Используемый в настоящем документе термин «приблизительно» используется для обозначения количества, которое примерно, около, практически или почти равняется установленному количеству, например, установленное количество плюс/минус приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%.

[0046] Используемый в настоящем документе термин «адъювант» относится к веществу, которое усиливает иммунный ответ организма на антиген, в настоящем раскрытии адъювант усиливает клеточно-опосредованный иммунный ответ, индуцированный комбинацией первой композиции, второй композиции и/или третьей композиции. В контексте настоящего документа адъювант объединяют с любой или со всеми из первой композиции, второй композиции и/или третьей композиции. Адъювант отличается от третьей композиции настоящего раскрытия. Примеры адъювантов, которые можно использовать для усиления клеточного иммунного ответа, включают в себя, без ограничения, агонист Toll-подобных рецепторов (TLR): например, агонист TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 или TLR9 или агонист STING, cGAS, NOD1, NOD2 или IRF3.

[0047] Под «введением» подразумевается введение композиции или комбинации вакцин по настоящему раскрытию субъекту; оно также может относиться к действию

предоставления композиции согласно настоящему раскрытию субъекту (например, путем прописывания). Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к тому количеству вводимого соединения, которое будет индуцировать клеточно-опосредованный иммунный ответ. Термин также относится к количеству настоящих композиций или комбинаций, которые облегчат или предотвратят до некоторой степени один или более симптомов состояния, которое необходимо лечить. Что касается состояний/заболеваний, которые можно лечить непосредственно композицией по настоящему раскрытию, терапевтически эффективное количество относится к тому количеству, которое вызывает эффект предотвращения возникновения состояния/заболевания у животного, которое может быть предрасположено к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет симптомы состояния/заболевания (профилактическое лечение), облегчение симптомов состояния/заболевания, уменьшение степени состояния/заболевания, стабилизацию (например, не ухудшение) состояния/заболевания, предотвращение распространения состояния/заболевания, задержку или замедление прогрессирования состояния/заболевания, улучшение или облегчение состояния/патологического состояния и их комбинаций. Термин «эффективное количество» относится к такому количеству вводимого соединения, которое вызовет реакцию, отличную от реакции, которая произошла бы в отсутствие соединения. Что касается вариантов осуществления настоящего раскрытия, включающих в себя иммунотерапевтические соединения по настоящему раскрытию, «эффективное количество» представляет собой такое количество, которое увеличивает иммунологический ответ у реципиента по сравнению с ответом, который можно было бы ожидать без введения соединения.

[0048] Термин «животное» относится к млекопитающим, включая в себя людей, лошадей, собак, кошек, свиней, домашний скот и любого другого млекопитающего, наряду с птицами. Используемый в настоящем документе термин «животное» также включает в себя отдельное животное на всех стадиях развития, включая в себя стадии новорожденного, эмбриона и плода.

[0049] Термин «хозяин» или «организм», используемый в настоящем документе, включает в себя людей, млекопитающих (например, кошек, собак, лошадей и т.д.), насекомых, живые клетки и другие живые организмы. Живой организм может быть таким же простым, как, например, одиночная эукариотическая клетка, или сложным, как млекопитающее. Типичными хозяевами, к которым относятся варианты осуществления настоящего раскрытия, будут млекопитающие, особенно приматы, особенно люди. Для ветеринарных применений будет подходящим широкий круг субъектов, например,

домашний скот, такой как крупный рогатый скот, овцы, козы, коровы, свиньи и т.п.; домашняя птица, такая как куры, утки, гуси, индейки и т.п.; и домашние животные, особенно домашние животные, такие как собаки и кошки. Для исследовательских применений подходящими субъектами будут самые разные млекопитающие, включая в себя грызунов (например, мышей, крыс, хомяков), кроликов, приматов и свиней, таких как инбредные свиньи и т.п. Кроме того, для приложений *in vitro*, таких как приложения для исследований *in vitro*, подходящими для применения будут жидкости организма и образцы клеток вышеупомянутых субъектов, например, кровь, моча или образцы тканей млекопитающих (особенно приматов, таких как человек), или кровь, моча или образцы тканей животных, указанных для ветеринарного применения. Хозяев, которые «предрасположены» к состоянию(ям), можно определить как хозяев, которые не проявляют явных симптомов одного или более из этих состояний, но которые генетически, физиологически или иным образом подвержены риску развития одного или более из этих состояний.

[0050] Термины «белок», «полипептид» и «пептид» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Однако термины можно различить следующим образом. «Белок», как правило, относится к конечному продукту транскрипции, трансляции и посттрансляционных модификаций в клетке. Используемый в настоящем документе термин «полипептид» может относиться к «белку» или «пептиду». «Пептид», в отличие от «белка», как правило, представляет собой короткий полимер аминокислот, как правило, составляющий в длину 100 или менее аминокислот.

[0051] Композиции, составы и способы по настоящему изобретению могут содержать, состоять по существу из или состоять из компонентов и ингредиентов настоящего изобретения, а также других ингредиентов, описанных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин «состоящий по существу из» означает, что композиции, составы и способы могут предусматривать дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты, но только если дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты не изменяют существенно основные и новые характеристики заявленных композиций, составов и способов.

[0052] Следует также отметить, что используемый в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, термин «сконфигурированный» описывает систему, устройство или другую структуру, которая сконструирована или сконфигурирована для выполнения конкретной задачи или принятия конкретной конфигурации. Термин «сконфигурированный» может использоваться взаимозаменяемо с другими подобными фразами, такими как организованный и сконфигурированный, сконструированный и

скомпонованный, адаптированный и сконфигурированный, адаптированный, сконструированный, изготовленный и скомпонованный и т.п.

[0053] Используемый в настоящем документе термин «аденовирус человека» предназначен для охвата всех аденовирусов человека семейства *Adenoviridae*, которые включают в себя представителей рода *Mastadenovirus*. На сегодняшний день идентифицировано более 51 серотипа аденовирусов человека (смотрите, например, Fields et al., *Virology* 2, Ch. 67 (3-е изд., Lippincott-Raven Publishers)). Аденовирус может относиться к серогруппе А, В, С, D, Е или F. Аденовирус человека может представлять собой серотип 1 (Ad 1), серотип 2 (Ad2), серотип 3 (Ad3), серотип 4 (Ad4), серотип 5 (Ad5), серотип 6 (Ad6), серотип 7 (Ad7), серотип 8 (Ad8), серотип 9 (Ad9), серотип 10 (Ad10), серотип 11 (Ad11), серотип 12 (Ad12), серотип 13 (Ad13), серотип 14 (Ad14), серотип 15 (Ad15), серотип 16 (Ad16), серотип 17 (Ad17), серотип 18 (Ad18), серотип 19 (Ad19), серотип 19a (Ad19a), серотип 19p (Ad19p), серотип 20 (Ad20), серотип 21 (Ad21), серотип 22 (Ad22), серотип 23 (Ad23), серотип 24 (Ad24), серотип 25 (Ad25), серотип 26 (Ad26), серотип 27 (Ad27), серотип 28 (Ad28), серотип 29 (Ad29), серотип 30 (Ad30), серотип 31 (Ad31), серотип 32 (Ad32), серотип 33 (Ad33), серотип 34 (Ad34), серотип 35 (Ad35), серотип 36 (Ad36), серотип 37 (Ad37), серотип 38 (Ad38), серотип 39 (Ad39), серотип 40 (Ad40), серотип 41 (Ad41), серотип 42 (Ad42), серотип 43 (Ad43), серотип 44 (Ad44), серотип 45 (Ad45), серотип 46 (Ad46), серотип 47 (Ad47), серотип 48 (Ad48), серотип 49 (Ad49), серотип 50 (Ad50), серотип 51 (Ad51) или их комбинации, но не ограничиваются этими примерами. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирус относится к серотипу 5 (Ad5).

[0054] Используемый в настоящем документе термин «иммуномодулятор» относится к ряду способов лечения, направленных на использование иммунной системы пациента для достижения иммунного контроля, стабилизации и потенциальной ликвидации заболевания. Например, иммуномодулятор может представлять собой вещество, используемое для нарушения толерантности (такое, которое может присутствовать при хронической инфекции или некоторых аутоиммунных заболеваниях); или вещество, используемое для инактивации иммуносупрессорных клеток для индукции или усиления опосредованного клеткой-хозяином иммунного ответа против чужеродного или собственного (например, ракового) антигена; или иммуностимулирующее вещество, также используемое для индукции или усиления опосредованного клеткой-хозяином иммунного ответа против чужеродного или собственного (например, ракового) антигена. Согласно вариантам осуществления иммуномодуляторы содержат вещество, которое модулирует

пути Т-клеток и может активизировать противоопухолевый или противовирусный иммунный ответ.

[0055] «Фармацевтическая композиция» относится к смеси одного или более вакцинных соединений, описанных в настоящем документе, их производных или их фармацевтически приемлемых солей с другими химическими компонентами, такими как фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Одна из целей фармацевтической композиции заключается в том, чтобы облегчить введение соединения в организм.

[0056] Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения организма и не отменяет биологическую активность и свойства вводимых вакцинных композиций.

[0057] Термины «лечить» и «лечение» представляют собой подход к получению благоприятных или желаемых клинических результатов. В частности, благоприятные или желаемые клинические результаты включают в себя, помимо прочего, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (например, не ухудшение) заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, существенное предотвращение распространения заболевания, улучшение или смягчение патологического состояния и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую. Кроме того, «лечить» и «лечение» также могут означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения и/или могут быть терапевтическими с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Используемые в настоящем документе термины «профилактически лечить» или «профилактическое лечение» относятся к полному, существенному или частичному предотвращению заболевания/состояния или одного или более его симптомов у хозяина. Аналогичным образом, «отсрочка начала состояния» также может быть включена в «профилактическое лечение» и относится к действию увеличения времени до фактического возникновения состояния у пациента, который предрасположен к этому состоянию.

[0058] Как упоминается в настоящем документе, «вакцина» может включать в себя антиген или вектор вместе с другими компонентами вакцинного состава, включая в себя, например, адъюванты, соединения с медленным высвобождением, растворители и т.д. Хотя вакцины традиционно применяются для предотвращения или лечения инфекционных заболеваний, вакцины также способны изменять функцию метаболитов путем связывания сигнальных пептидов или белков или их рецепторов и путем блокирования антигенов,

уникальных для определенных типов аномальных клеток, таких как, например, опухоли. Соответственно, это вариант осуществления предусматривает вакцины для улучшения иммунного ответа на любой антиген независимо от источника антигена или его функции, включая в себя антигены для изменения физиологических функций, которые желательны для улучшения здоровья, например, иммунизации против рака.

[0059] Как упоминается в настоящем документе, «вектор» несет генетический код или его часть для антигена, однако он не является самим антигеном. Согласно иллюстративному аспекту вектор может включать в себя вирусный вектор или бактериальный вектор. В данном контексте «антиген» означает вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у субъекта, включая в себя людей и/или животных. Антиген может включать в себя целый организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; кусок или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунный ответ при представлении животному-хозяину; полипептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. Согласно различным аспектам антиген представляет собой вирус, бактерию, субъединицу организма, аутоантиген или раковый антиген.

[0060] *Комбинации вакцин*

[0061] В настоящем документе предложены комбинации вакцин, которые содержат первую композицию и вторую композицию, причем эти композиции служат в качестве гетерологичной первичной дозы и бустерной дозы для индукции опосредованного Т-клетками иммунитета. Первая композиция и вторая композиция содержат один или более одинаковых эпитопов CD8⁺ Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления первая или вторая композиция может содержать полноразмерный антиген или иммуноген или их фрагмент, каждый из которых также упоминается в настоящем документе как «полипептид». Согласно определенным вариантам осуществления первичная доза (в виде первой или второй композиции) включает в себя полноразмерный антиген или иммуноген, а бустерная доза (в виде первой или второй композиции) включает в себя его фрагмент, такой как пептид, включая в себя химерный пептид. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первичная доза (в виде первой или второй композиции) включает в себя фрагмент антигена или иммуногена, такого как пептид, включая в себя химерные пептиды, а бустерная доза (в виде первой или второй композиции) включает в себя полноразмерный антиген или иммуноген. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первичная доза (в виде первой или второй композиции) включает в себя фрагмент антигена или иммуногена, такого как пептид, включая в себя химерные пептиды, а бустерная доза (в виде первой или второй композиции) включает в себя фрагмент антигена или иммуногена,

такого как пептид, включая в себя химерные пептиды. Используемый в настоящем документе термин «гетерологичный» относится не к антигену или иммуногену, а к вектору доставки или носителю, связанному с антигеном или иммуногеном.

[0062] Согласно вариантам осуществления первая и вторая композиции содержат вектор доставки или носитель, который может включать в себя пептиды, липофильные цепи или векторы экспрессии, включая в себя нереплицирующиеся вирусные векторы. Согласно определенным вариантам осуществления носитель может представлять собой углеводородную цепь, необязательно замещенную одним или более атомами галогена. Согласно определенным вариантам осуществления носитель может представлять собой фторуглеродную цепь. Согласно определенным вариантам осуществления вектор доставки может представлять собой нереплицирующийся вирусный вектор, такой как вектор, выбранный из вектора аденовируса, вектора альфавируса, вектора вируса герпеса, вектора вируса кори, вектора поксвируса или вектора вируса везикулярного стоматита. Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и/или E3. Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся аденовирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор человека.

[0063] В настоящем документе представлены комбинации вакцин, содержащие первую композицию и вторую композицию, причем первая композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток, а вторая композиция содержит мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена. Любая из первой или второй композиции может представлять собой первичную или бустерную дозу. Для обеспечения гетерологичной схемы введения каждая из первой и второй композиций должна вводиться нуждающемуся в этом животному, одна в качестве первичной дозы, а другая в качестве бустерной дозы.

[0064] Дополнительные варианты осуществления, представленные в настоящем документе, представляют собой комбинации вакцин, которые содержат первую композицию или вторую композицию и третью композицию, причем первая или вторая композиция индуцирует Т-клеточный иммунитет, а третья композиция представляет собой иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора, который в комбинации усиливает антигенспецифический Т-клеточный ответ. Первая композиция и

вторая композиция содержат один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления первая или вторая композиция может содержать полноразмерный антиген или иммуноген или их фрагмент, каждый из которых также упоминается в настоящем документе как «полипептид». Согласно определенным вариантам осуществления первая композиция содержит полноразмерный антиген или иммуноген. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первая композиция содержит фрагмент антигена, такой как пептид, включая в себя химерный пептид. Согласно определенным вариантам осуществления вторая композиция содержит полноразмерный антиген или иммуноген. Согласно некоторым другим вариантам осуществления вторая композиция содержит фрагмент антигена или иммуногена, такого как пептид, включая в себя химерные пептиды.

[0065] В настоящем документе представлены комбинации вакцин, содержащие первую композицию или вторую композицию и третью композицию, причем первая композиция содержит нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; вторая композиция содержит мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток антигена или иммуногена; а третья композиция содержит иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора.

[0066] *Антиген и иммуногены*

[0067] Выбор антигена или иммуногена (которые могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо) определяется тем, являются ли Т-клеточные ответы против антигена защитными и/или терапевтическими или, как ожидается, будут защитными и/или терапевтическими, либо у людей, либо на модели на животных. Степень полиморфизма, обнаруженного между различными изолятами антигена, а также высококонсервативными антигенами, полиморфизмом молекул HLA или высококонсервативными эпитопами внутри антигенов, также является факторами при выборе антигенов. Смотрите патент США № 8642531 и публикацию патента США № 2016/0106830 для композиций Т-клеточной вакцины на основе высококонсервативных антигенных Т-клеточных эпитопов и полиморфизма молекул HLA в различных популяциях и/или этнических группах людей, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Смотрите также публикацию патента США № 2016/0199469 в абзацах с [0121] по [0134], содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным

вариантам осуществления также могут быть выбраны антигены, которые представляют собой комбинацию консервативных областей или консервативных эпитопов из одного или более антигенов для получения синтетического вакцинного антигена [Goodman AL, *et al.* New candidate vaccines against blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria: prime-boost immunization regimens incorporating human and simian adenoviral vectors and poxviral vectors expressing an optimized antigen based on merozoite surface protein 1. *Infection and Immunity* 2010;78(11):4601-12; Letourneau S, *et al.* Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS ONE* 2007;2(10):e984]. Согласно определенным вариантам осуществления комбинация может быть в форме пула пептидов или полипептидов в первой или второй композиции вакцин или в виде химерного пептида или полипептида в первой или второй композиции вакцин. Согласно определенным вариантам осуществления первая и вторая композиции вакцин содержат более одного антигена, чтобы снизить вероятность ускользания от иммунного ответа. Смотрите публикацию патента США № 2016/0199469 в отношении Т-клеточной онкологической вакцины, содержащей два или более антигенов, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0068] Эпитопы Т-клеток в антигенах могут быть идентифицированы либо с помощью прогнозирования биоинформатики и экспериментального подтверждения, либо с помощью эмпирического подхода с использованием библиотеки пептидов, охватывающих полную последовательность антигена. Смотрите пример 1 для получения дополнительной информации об идентификации эпитопов Т-клеток (как CD8+, так и CD4+). Однако, хотя знание эпитопов, представленных общими типами HLA, может быть применимо при проведении подробных фенотипических исследований Т-клеточных ответов в клинических исследованиях и разработке вакцины, полное знание всех возможных эпитопов, содержащихся в антигене, не является необходимым. Композиции текущих вакцин, первая и/или вторая композиции, содержат по меньшей мере один эпитоп CD8+ Т-лимфоцитов. Согласно определенным вариантам осуществления первая и вторая композиции содержат по меньшей мере два, три, четыре, пять или по меньшей мере шесть эпитопов CD8+ Т-клеток. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первая и/или вторая композиция вакцины дополнительно содержит один или более эпитопов CD4+ Т-клеток. Понятно, что антигены в форме полипептидов в композициях вакцин могут содержать один или более Т-клеточных эпитопов, которые не идентифицируются с использованием инструментов, доступных для идентификации.

[0069] Согласно вариантам осуществления антиген/иммуноген может соответствовать меньшей части или полипептиду, полученному из полноразмерной последовательности антигена, который может быть выбран на основе консервативности

последовательности и/или присутствия эпитопов CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Эпитопы CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток могут быть идентифицированы с использованием инструментов биоинформатики, идентифицирующих связывающие последовательности HLA класса I и/или HLA класса II, анализов *in vitro* с использованием образцов PBMC человека или анализов связывания HLA класса I и/или HLA класса II *in vitro*. Иммуноген может быть получен путем искусственной конкатенации меньших участков последовательности или полипептидов, полученных из одной или более последовательностей антигена одного и того же патогена. Конкатенатные последовательности можно использовать для создания синтетических пептидных иммуногенов, или соответствующая последовательность ДНК может быть включена в аденовирусный вектор.

[0070] Согласно определенным вариантам осуществления антиген или иммуноген происходит от патогена, ракового антигена или аутоантигена. Согласно определенным вариантам осуществления антиген или иммуноген представляет собой неоантиген. Используемый в настоящем документе термин «неоантиген» относится к известному белку-хозяину с одной или более заменами аминокислот по сравнению с диким типом, который позволяет иммунной системе хозяина распознавать как чужеродный. Неоантигены могут быть уникальными для каждого пациента, и поэтому в контексте настоящего документа их можно называть вариантами белка, включая в себя клинические варианты, идентифицированные у отдельных пациентов. Человеческие клинические варианты могут быть идентифицированы с использованием хорошо известных баз данных, которые предоставляют общедоступный архив отчетов о взаимосвязях между человеческими вариациями и фенотипами. Landrum MJ, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D862-8. Эти неоантигены или клинические варианты картированы для эпитопов CD8⁺ Т-клеток, которые затем позволяют разработать настоящие комбинации вакцин. Раскрытие использования хорошо известных инструментов для картирования Т-клеточных эпитопов антигенов или иммуногенов представлено в примере 1.

[0071] Согласно определенным вариантам осуществления антиген или иммуноген происходит от патогена, включая в себя те, которые, как известно, приводят к развитию рака (и, таким образом, могут экспрессироваться на поверхности раковых клеток). Согласно вариантам осуществления патоген представляет собой вирус, гриб, паразит или бактерии. Согласно определенному варианту осуществления антиген или иммуноген происходят из вируса, выбранного из EBV, HPV, HTLV-1, MCPvV, KSHV или HERV. Известно, что каждый из этих вирусов вызывает рак или рост опухоли. Согласно определенным

вариантам осуществления антиген или иммуноген происходят из вируса HCV (вирус гепатита С) или HBV (вирус гепатита В).

[0072] Согласно определенным вариантам осуществления антиген или иммуногены могут представлять собой один или более из следующих: EBV (EBNA1, LMP1, LMP2 и BARF1), HPV (от E1 до E7), HTLV-1 (tax), MCPyV (большой Т, маленький Т), KSHV (Orf73, Orf57, K10.5 и K12), CMV (гликопротеин В и фосфопротеин 65), BKV ((большой Т, маленький Т), JCV (большой Т, маленький Т), SV40 (большой Т, маленький Т), HERV (Env, Gag, Pol), HMTV (Env, Gag, Pol), HIV-1 (Env, Gag, Pol, Nef, Tat, Vif), HCV (Core, NS3, NS4, NS5), HBV (Core, Pol, Env и X), грипп (HA, NP, NA, M1, PB1, PB2, PA), HRV (VP1-4, 2A-C, 3A-D), *Mycobacterium tuberculosis* (Ag85A, ASAT-6, RpfE, CFP-10) и *Plasmodium falciparum* (MSP-1, AMA-1, RTS, S, Pfs25).

[0073] Согласно вариантам осуществления антиген индуцирует иммунный ответ против патогенов, включая в себя, например, вирус. Примеры вирусов включают в себя ортомиксовирус, парамиксовирус, риновирус, коронавирусы, вирус гриппа, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирус простуды или вирус кори, вирус герпеса, вирус бешенства, ветряную оспу, вирус папилломы человека (HPV), вирус гепатита или другие известные вирусные патогены.

[0074] Согласно вариантам осуществления антиген индуцирует иммунный ответ против бактериальных патогенов. Примеры бактерий включают в себя *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Mycoplasma* и/или *Bacillus anthracis*. Согласно определенным вариантам осуществления антиген вызывает иммунный ответ против грибкового патогена. Согласно вариантам осуществления грибок включает в себя *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* и/или *Stachybotrys*.

[0075] Согласно вариантам осуществления антиген может включать в себя аллерген или антиген, связанный с опухолью. Согласно еще одному дополнительному аспекту антиген может включать в себя полипептиды, пептиды или их панели, которые содержат один или более эпитопов белка, связанного с заболеванием. Например, подходящие полипептиды, пептиды или их панели могут содержать один или более эпитопов белка, связанного с патогеном. Подходящие полипептиды могут содержать полноразмерную аминокислотную последовательность соответствующего белка патогена или его фрагмента.

[0076] *Первая композиция комбинации вакцин*

[0077] Согласно вариантам осуществления первая композиция содержит не реплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток. Согласно определенным вариантам

осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, вектор альфавируса, вектор вируса герпеса, вектор вируса кори, вектор поксвируса или вектор вируса везикулярного стоматита. Согласно иллюстративным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор. Делеция или нарушение последовательности E1 и/или E3 приводит к нереплицирующемуся аденовирусному вектору.

[0078] Согласно вариантам осуществления композиции и составы включают в себя вектор, а именно вирусный вектор. В настоящем документе «вирусный вектор» представляет собой сконструированный вирус, который включает в себя гены антигена и экспрессирует его. Вирусные векторы могут быть нереплицирующимися и представлять безопасность для хозяина и окружающей среды. Следует понимать, что любой вирусный вектор может быть включен в композиции, составы и способы по настоящему изобретению для осуществления доставки в клетку.

[0079] Иллюстративные вирусные векторы включают в себя, среди прочего, аденовирус, ретровирус, лентивирус, вирус герпеса, вирус оспы, альфа-вирус, аденоассоциированные вирусы. Многие такие вирусные векторы доступны в настоящей области техники. Описанные в настоящем документе векторы могут быть сконструированы с использованием стандартных рекомбинантных технологий, широко доступных специалистам в настоящей области техники. Такие способы можно найти в общих справочных материалах по молекулярной биологии, таких как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology* (Methods in Enzymology, Vol. 185, под редакцией D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.) и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.).

[0080] Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирус, включая в себя, например, аденовирус крупного рогатого скота, аденовирус собак, аденовирус отличных от человека приматов, аденовирус курицы или аденовирус свиньи. Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирус человека.

[0081] Согласно вариантам осуществления нереплицирующиеся аденовирусные векторы особенно применимы для переноса генов в эукариотические клетки и разработки вакцины, а также в моделях на животных.

[0082] Согласно вариантам осуществления любой аденовирусный вектор (Ad-вектор), известный специалисту в настоящей области техники и подготовленный для

введения млекопитающему, который может содержать и экспрессировать антиген или иммуноген, можно использовать в композициях и в способах настоящей заявки. Такие Ад-векторы включают в себя любые из тех, что указаны в патентах США № 6706693; 6716823; 6348450 или публикациях патентов США № 2003/0045492; 2004/0009936; 2005/0271689; 2007/0178115; 2012/0276138 (полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

[0083] Согласно определенным вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор может быть нереплицирующимся или дефицитным по репликации, требующим для репликации комплементарной активности E1. Согласно вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор может включать в себя E1-дефектные, E3-дефектные и/или E4-дефектные аденовирусные векторы или «выпотрошенный» аденовирусный вектор, в котором вирусные гены удалены. Мутация E1 увеличивает предел безопасности вектора, поскольку мутанты аденовируса с дефектом E1 неспособны к репликации в непермиссивных клетках. Мутация E3 увеличивает иммуногенность антигена, нарушая механизм, посредством которого аденовирус подавляет молекулы МНС класса I. Мутация E4 снижает иммуногенность аденовирусного вектора за счет супрессии экспрессии позднего гена, что может позволить повторную ревакцинацию с использованием того же вектора. Согласно вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор представляет собой вектор, дефектный по E1 и/или E3.

[0084] Репликация «выпотрошенного» аденовирусного вектора требует вируса-помощника и специальной линии клеток человека 293, экспрессирующих как E1a, так и Cre, состояние, которое не существует в естественной среде; вектор лишен вирусных генов, поэтому вектор в качестве носителя вакцины не является иммуногенным и может быть многократно инокулирован для повторной вакцинации. «Выпотрошенный» аденовирусный вектор также содержит пространство размером 36 т.п.н. для размещения трансгенов, что обеспечивает совместную доставку большого количества генов антигенов в клетки. Специфические мотивы последовательности, такие как мотив RGD, могут быть вставлены в петлю Н-I аденовирусного вектора для повышения его инфекционности. Рекомбинант аденовируса может быть сконструирован путем клонирования специфических трансгенов или фрагментов трансгенов в любой из аденовирусных векторов, таких как описанные ниже. Рекомбинантный вектор аденовируса используется для трансдукции эпидермальных клеток позвоночного в неинвазивном режиме для применения в качестве иммунизирующего средства. Аденовирусный вектор также можно применять для инвазивных способов введения, таких как внутривенная, внутримышечная или подкожная инъекция.

[0085] Согласно вариантам осуществления первая композиция, содержащая нереплицирующийся вирусный вектор, экспрессирующий антиген или иммуноген представляющей интерес комбинации вакцин, может быть составлена для введения млекопитающему. Что касается дозировок, путей введения, составов, адъювантов и применений для рекомбинантных вирусов и продуктов их экспрессии, композиции по настоящему изобретению можно использовать для парентерального введения или введения через слизистые оболочки, предпочтительно внутрикожным, подкожным, интраназальным или внутримышечным путями. Когда используется введение через слизистую оболочку, можно использовать пероральный, глазной или назальный пути.

[0086] Составы, которые могут содержать представляющий интерес аденовирусный вектор, могут быть приготовлены в соответствии со стандартными технологиями, хорошо известными специалистам в области фармацевтики или ветеринарии. Такие составы можно вводить в дозах и способами, хорошо известными специалистам в настоящей области техники, с учетом таких факторов, как возраст, пол, масса и способ введения. Составы можно вводить отдельно или их можно вводить совместно или последовательно с композициями, например, с «другой» иммунологической композицией, или аттенуированной, инактивированной, рекомбинантной вакциной или терапевтическими композициями, тем самым обеспечивая поливалентные или «коктейльные» или комбинированные композиции по настоящему изобретению и способы их применения. Согласно вариантам осуществления составы могут содержать сахарозу в качестве криопротектора и полисорбат-80 в качестве неионогенного поверхностно-активного вещества. Согласно определенным вариантам осуществления составы дополнительно содержат ингибиторы свободнорадикального окисления этанол и гистидин, хелатор ионов металлов этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) или другие средства с сопоставимой активностью (например, блокируют или предотвращают радикальное окисление, катализируемое ионами металлов).

[0087] Составы могут присутствовать в жидком препарате для введения через слизистую оболочку, например, пероральном, назальном, глазном и т.д., такие составы как суспензии и препараты для парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного, внутривенного введения (например, инъекционного введения), такие как стерильные суспензии или эмульсии. В таких составах аденовирусный вектор может находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор или т.п. Составы также могут быть лиофилизированы или заморожены. Составы могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные средства pH, адъюванты,

консерванты и т.п., в зависимости от пути введения и желаемого препарата. Составы могут содержать по меньшей мере одно адъювантное соединение.

[0088] Стандартные тексты, такие как «REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE», 17-е издание, 1985, включенные в настоящий документ посредством ссылки, можно использовать для приготовления подходящих препаратов без излишних экспериментов.

[0089] *Вторая композиция комбинации вакцин*

[0090] Согласно вариантам осуществления вторая композиция содержит мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более CD8⁺ эпитопов Т-клеток антигена или иммуногена.

[0091] Согласно вариантам осуществления пептид составляет в длину от 20 до 60 аминокислот, например, от 25 до 50 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, например, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления пептид может включать в себя дополнительные короткие аминокислотные последовательности. Дополнительные последовательности могут облегчить производство или составление пептида или повысить стабильность пептида. Например, пептид может содержать одну или более дополнительных аминокислот, как правило, на N-конце и/или C-конце, для увеличения суммарного положительного заряда пептида и/или для снижения гидрофобности пептида. Чистый положительный заряд может быть увеличен так, чтобы пептид имел изоэлектрическую точку больше или равную 7.

[0092] Согласно определенным вариантам осуществления одна или более, например, две или три положительно заряженных аминокислоты (аргинин и/или лизин), добавляются к N- и/или C-концу одного или более пептидов в композиции. Например, три остатка лизина (KKK) могут быть добавлены к N- и/или C-концу одного или более пептидов. Смотрите таблицу 2. Положительные аминокислоты, как правило, добавляются на конце(ах) пептидов, которые характеризуются общей гидрофобностью более чем 65%, общим зарядом менее нуля и/или включают в себя кластер гидрофобных аминокислот.

[0093] Согласно вариантам осуществления, где пептид связан с фторуглеродом, конец пептида, такой как конец, который не конъюгирован с фторуглеродом, или другое присоединение, может быть изменен, например, для повышения растворимости конструкции фторуглерод-пептид за счет образования мицелл. Чтобы облегчить крупномасштабный синтез конструкции, N- или C-концевые аминокислотные остатки пептида могут быть модифицированы. Когда желаемый пептид особенно чувствителен к

расщеплению пептидазами, нормальная пептидная связь может быть заменена нерасщепляемым пептидным миметиком. Такие связи и способы синтеза хорошо известны в настоящей области техники.

[0094] Пептид может представлять собой нативный пептид. Нативный пептид может иметь свободные или модифицированные концевые части. Пептид может быть модифицирован для увеличения продолжительности жизни, такой как период полужизни или персистенции в месте введения, пептида *in vivo* или для направления пептида к антигенпрезентирующим клеткам. Например, иммуногенный пептид может содержать одну или более не природных аминокислот и/или не встречающихся в природе ковалентных связей для ковалентного связывания соседних аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления нестандартные, не природные аминокислоты также могут быть включены в иммуногенные пептиды при условии, что они не влияют на способность пептида взаимодействовать с молекулами HLA и остаются перекрестно реактивными с Т-клетками, распознающими природные последовательности. Не природные аминокислоты могут использоваться для улучшения устойчивости пептидов к протеазам или химической стабильности. Примеры не природных аминокислот включают в себя модификации D-аминокислот и цистеина.

[0095] Согласно вариантам осуществления вторая композиция может содержать несколько пептидов, связанных с фторуглеродными цепями. Соответственно, композиция может содержать по меньшей мере два, например, по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или более пептидов. Согласно иллюстративным вариантам осуществления вторая композиция содержит четыре пептида, каждый из которых связан с фторуглеродной цепью. Смотрите пример 1.

[0096] Способен ли пептид вызывать пептид-специфический ответ в Т-клетках больного раком пациента, пациента с хронической инфекцией или здорового субъекта, может быть определено любыми подходящими способами, как правило, путем тестирования образца периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC), взятых у указанного пациента или субъекта в подходящем анализе. Таким образом, Т-клеточный ответ выявляется в образце *in vitro*. Подходящие анализы могут измерять или обнаруживать активацию Т-клеток после инкубации с исследуемым пептидом. На активацию Т-клеток, как правило, указывает секреция цитокина, такого как IFN-гамма, который может быть обнаружен в любом подходящем анализе, как правило, иммуноанализе, таком как ELISA или ELISpot. Величина Т-клеточного ответа пациента или субъекта может быть определена в том же анализе, например, путем количественной оценки количества цитокина,

высвобожденного в образце в целом или отдельной клеткой в образце, после инкубации с исследуемым пептидом. Подходящие анализы описаны ниже и в примерах.

[0097] Согласно определенным вариантам осуществления вторая композиция по настоящему изобретению содержит пептид или пептиды, которые индуцируют специфический ответ CD8⁺ Т-клеток по меньшей мере у 20% здоровых субъектов и/или пациентов с раком. Иммунологические анализы для измерения пептид-специфических Т-клеточных ответов в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) от здоровых субъектов или больных раком можно проводить с помощью ELISpot цитокинов, таких как анализ ELISpot IFN- γ или окрашивание внутриклеточных цитокинов с помощью проточной цитометрии. Анализы можно проводить как со свежими, так и с замороженными PBMC. Анализы можно проводить либо *ex vivo*, либо после кратковременного культивирования *in vitro* PBMC, инкубированных с одним пептидом или композицией, содержащей несколько антигенных пептидов. Количество пептида(ов) в краткосрочной культуре *in vitro* может варьироваться от 0,001 мкг на пептид до 100 мкг/пептид. Время инкубации краткосрочных культур *in vitro* может составлять от 5 до 15 дней, например, от 7 до 13 дней или от 9 до 11 дней. Краткосрочное культивирование *in vitro* можно проводить в присутствии цитокинов, таких как один или более из IL-2, IL-15 и IL-7, предпочтительно IL-2 и IL-15. Краткосрочное культивирование *in vitro* можно проводить после истощения Т-регуляторных клеток и/или НК-клеток. Истощение таких клеток может быть особенно желательным, если PBMC взяты от больного раком. Краткосрочное культивирование *in vitro* может быть выполнено в присутствии нейтрализующих IL-10 антител, антител к PD1, антител к CTLA-4, антител к OX-40, антител к GITR, денилейкина, дифтитокса, ингибиторов киназ и/или агонистов рецепторов toll, включая в себя агонисты TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9.

[0098] Согласно определенным вариантам осуществления носитель представляет собой углеводородную цепь, замещенную одним или более атомами галогена. Согласно вариантам осуществления носитель представляет собой углеводородную цепь, замещенную одним или более атомами фтора, в настоящем документе именуемую «фторуглеродной цепью».

[0099] Фторуглерод может содержать одну или более цепей, полученных из перфторуглеродных или смешанных фторуглерод/углеводородных радикалов, и может быть насыщенным или ненасыщенным, при этом каждая цепь содержит от 3 до 30 атомов углерода. Таким образом, цепи фторуглеродного присоединения, как правило, являются насыщенными или ненасыщенными, предпочтительно насыщенными. Цепи во фторуглеродном присоединении могут быть линейными или разветвленными, но

предпочтительно линейными. Каждая цепь, как правило, содержит от 3 до 30 атомов углерода, от 5 до 25 атомов углерода или от 8 до 20 атомов углерода. Чтобы ковалентно связать фторуглеродный вектор с пептидом, в вектор включают реакционноспособную группу или лиганд, например —CO— , —NH— , S, O или любую другую подходящую группу. Использование таких лигандов для достижения ковалентных связей хорошо известно в настоящей области техники. Реакционноспособная группа может находиться в любом положении фторуглеродного вектора.

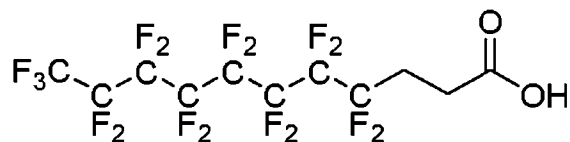
[00100] Связывание фторуглеродного вектора с пептидом может быть достигнуто с помощью функциональных групп, таких как —OH , —SH , —COOH и —NH_2 , естественно присутствующих или введенных в любой сайт пептида. Примеры таких связей включают в себя амидные, гидразоновые, дисульфидные, тиозфирные и оксимные связи.

[00101] Необязательно, спейсерный элемент (пептидный или непептидный) может быть включен для обеспечения возможности отщепления пептида от фторуглеродного элемента для процессинга внутри антигенпрезентирующей клетки и для оптимизации стерической презентации пептида. Спейсер также может быть включен, чтобы способствовать синтезу молекулы и улучшить ее стабильность и/или растворимость. Примеры спейсеров включают в себя полиэтиленгликоль (PEG) или аминокислоты, такие как лизин или аргинин, которые могут расщепляться протеолитическими ферментами.

[00102] Согласно определенным вариантам осуществления связанный с фторуглеродом пептид может характеризоваться химической структурой $\text{C}_m\text{F}_n\text{—C}_y\text{H}_x\text{—}$ (Sp)-R или его производными, где $m = \text{от } 3 \text{ до } 30$, $n \leq 2m+1$, $y = \text{от } 0 \text{ до } 15$, $x \leq 2y$, $(m+y) = \text{от } 3 \text{ до } 30$, и Sp представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а R представляет собой иммуногенный пептид. Как правило, m и n удовлетворяют соотношению $2m-1 \leq n \leq 2m+1$, и предпочтительно $n=2m+1$. Как правило, x и y удовлетворяют соотношению $2y-2 \leq x \leq 2y$, и предпочтительно $x=2y$. Предпочтительно фрагмент $\text{C}_m\text{F}_n\text{—C}_y\text{H}_x$ является линейным.

[00103] Согласно вариантам осуществления m составляет от 5 до 15, более предпочтительно от 8 до 12. Согласно другим вариантам осуществления y составляет от 0 до 8, более предпочтительно от 0 до 6 или от 0 до 4. Согласно вариантам осуществления фрагмент $\text{C}_m\text{F}_n\text{—C}_y\text{H}_x$ является насыщенным (т.е. $n=2m+1$ и $x=2y$) и линейным, и что $m = \text{от } 8 \text{ до } 12$ и $y = \text{от } 0 \text{ до } 6$ или от 0 до 4.

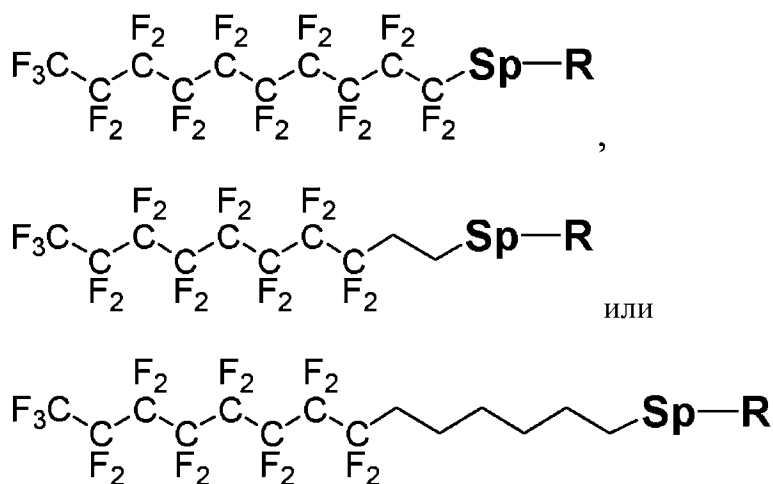
[00104] Согласно определенным вариантам осуществления фторуглеродный вектор является производным 2H, 2H, 3H, 3H-перфтоундекановой кислоты следующей формулы:



[00105]

[00106] Согласно вариантам осуществления присоединение фторуглерода представляет собой линейный насыщенный фрагмент $C_8F_{17}(CH_2)_2-$, который является производным $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$. Согласно определенным вариантам осуществления присоединения фторуглерода характеризуются следующими формулами: $C_6F_{13}(CH_2)_2-$, $C_7F_{15}(CH_2)_2-$, $C_9F_{19}(CH_2)_2-$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2-$, $C_5F_{11}(CH_2)_3-$, $C_6F_{13}(CH_2)_3-$, $C_7F_{15}(CH_2)_3-$, $C_8F_{17}(CH_2)_3-$ и $C_9F_{19}(CH_2)_3-$, которые являются производными $C_6F_{13}(CH_2)_2COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_2COOH$, $C_9F_{19}(CH_2)_2COOH$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2COOH$, $C_5F_{11}(CH_2)_3COOH$, $C_6F_{13}(CH_2)_3COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_3COOH$, $C_8F_{17}(CH_2)_3COOH$ и $C_9F_{19}(CH_2)_3COOH$, соответственно.

[00107] Согласно вариантам осуществления примеры подходящих структур для конструкций фторуглеродный вектор-антиген характеризуются формулой:



[00108] в которой Sp и R характеризуются указанными выше значениями. Согласно определенным вариантам осуществления Sp происходит от остатка лизина и характеризуется формулой $—CONH—(CH_2)_4—CH(NH_2)—CO—$. Согласно вариантам осуществления R представляет собой пептид длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происходит от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержит один или более эпитопов CD8+ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена.

[00109] Согласно определенным вариантам осуществления присоединение фторуглерода может быть модифицировано таким образом, что полученное соединение все еще способно доставлять пептид к антигенпрезентирующим клеткам. Таким образом, например, ряд атомов фтора может быть заменен другими атомами галогена, такими как хлор, бром или йод. Кроме того, можно заменить ряд атомов фтора метильными группами

или водородом и при этом сохранить свойства молекулы, описанные в настоящем документе.

[00110] Согласно вариантам осуществления пептиды могут быть связаны с фторуглеродным вектором через спейсерную составляющую. Согласно одному варианту осуществления спейсерный фрагмент представляет собой остаток лизина. Этот спейсерный остаток может присутствовать в дополнение к любым концевым остаткам лизина, как описано выше, так что пептид может, например, иметь всего четыре N-концевых остатка лизина. Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления вторая композиция по настоящему изобретению может содержать связанные с фторуглеродом пептиды, в которых пептиды содержат С-концевой или N-концевой остаток лизина, предпочтительно N-концевой остаток лизина. Согласно вариантам осуществления концевой лизин в пептидах связан с фторуглеродом, характеризующимся формулой $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$. Согласно вариантам осуществления фторуглерод связан с эпсилон-цепью N-концевого остатка лизина.

[00111] Согласно вариантам осуществления вторая композиция содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более иммуногенных пептидов, связанных с его собственным фторуглеродным вектором.

[00112] *Третья композиция комбинации вакцин*

[00113] Согласно вариантам осуществления третья композиция содержит иммунный модулятор. Иммунные модуляторы включают в себя ряд способов лечения (например, вещества или соединения), направленных на использование иммунной системы пациента для достижения иммунного контроля, стабилизации и потенциальной ликвидации заболевания.

[00114] Согласно вариантам осуществления иммуномодуляторы содержат антитела, блокирующие иммунные контрольные точки, которые модулируют Т-клеточные пути и обладают потенциалом активизировать противоопухолевый или противовирусный иммунный ответ. Согласно определенным вариантам осуществления ингибиторы иммунных контрольных точек включают в себя, без ограничения, ипилимумаб, первое одобренное FDA антитело иммунных контрольных точек, лицензированное для лечения метастатической меланомы, которое блокирует молекулу контрольной точки, называемую цитотоксическим Т-лимфоцитарным антигеном 4 (CTLA-4), и другие соединения (например, антитела), нацеленные на коингибирующие рецепторы, такие как CTLA-4, PD-1, Lag-3, Tim-3, TIGIT и/или Vista.

[00115] Согласно вариантам осуществления иммуномодуляторы содержат вещества, нацеленные на костимулирующие рецепторы, экспрессируемые Т-клетками, такими как

рецепторы фактора некроза опухоли (TNFR), включая в себя, помимо прочего, TNFR, индуцированный глюкокортикоидами (GITR; CD357), CD27, OX40, (CD134), ICOS (CD278) или 4-1BB (CD137), причем лигирование этих гликопротеинов с агонистическими антителами активно передает активирующие сигналы лимфоцитам.

[00116] Согласно определенным вариантам осуществления иммуномодуляторы включают в себя ингибиторы супрессивных миелоидных клеток, таких как, например, PDL1, PDL2, VISTA, B7-1, CD47, CD200, GLA1, GAL3, CLECG4 или SIRPa. Согласно вариантам осуществления иммуномодуляторы включают в себя соединения, нацеленные на ряд Toll-подобных рецепторов (TLR) и NOD-подобных рецепторов (NLR), которые представляют собой мишени для класса агонистов, но также и молекул антагонистов. Согласно дополнительным вариантам осуществления иммуномодуляторы включают в себя цитокины, которые, как известно, модулируют Т-клеточные ответы, такие как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), интерфероны, IL-2, IL-7 или IL-12.

[00117] Согласно вариантам осуществления третья композиция содержит ингибитор иммунных контрольных точек, который нацелен на PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD 137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3, GAL9, ADORA, CD276, VTCN1, IDO1, KIR3DL1, HAVCR2, VISTA или CD244. Смотрите, например, пример 5, который предоставляет способ нацеливания на PD1.

[00118] Согласно вариантам осуществления третья композиция содержит ингибитор иммунных контрольных точек, выбранный из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, цемиплимаба, REGN2810, BMS-936558, SHR1210, A31, KN035, IBI308, PDR001, BGB-A317, BCD-100 или JS001.

[00119] Согласно другим вариантам осуществления третья композиция содержит ингибитор MDSC, который нацелен на ADAM17, PEG-2, PDE5, COX2, iNOS2, PDE5, c-kit, ARG1, PI3K, CSF-1R, каспазу-8, CCL2, RON, ROS, S100A8/A9 или ядерный рецептор печени-X.

[00120] Согласно вариантам осуществления ингибитор MDSC представляет собой PF-5480090, INCB7839, нитроаспирин, SC58236, целекоксиб, IPI-549, PLX3397, BLZ945, GW2580, RG7155, IMC-CS4, AMG-820, ARRY-382, силденафил, тадалафил, варденафил, N-гидрокси-нор-L-Arg, иматиниб, z-IETD-FMK, трабектин, эмриказан, антитело к CCL2 (карлумаб или ABN912), тасквинимод, ASLAN002, IMC-RON8 или GW3965. Смотрите, например, Fleming et al. "Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression" Front Immunol. 2018; 9: 398.

[00121] Согласно вариантам осуществления иммунные ингибиторы составлены в виде подходящего водного раствора для введения, причем третья композиция вводится как отдельная композиция от первой или второй композиций вакцин. Согласно вариантам осуществления композиция иммунного ингибитора вводится в другое время и в другие дни, чем первая и/или вторая композиция вакцин.

[00122] *Способы применения*

[00123] Согласно вариантам осуществления, представленным в настоящем документе, предусмотрены способы индукции Т-клеточного ответа на антиген CD8+ посредством введения гетерологичной первичной и бустерной дозы вакцинной композиции. Согласно определенным вариантам осуществления эти способы предусматривают введение первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; и введение второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8+ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена, причем одна из первой композиции или второй композиции вводится в качестве первичной дозы, а другая из первой композиции или второй композиции вводится в виде бустерной дозы при условии, что вводятся как первая, так и вторая композиции.

[00124] Согласно вариантам осуществления первичная и бустерная доза вводятся с интервалом по меньшей мере 7 дней, с интервалом по меньшей мере 14 дней или дольше. Согласно вариантам осуществления первичная доза и бустерная доза вводятся с интервалом приблизительно 7 дней, с интервалом приблизительно 14 дней, с интервалом приблизительно 20 дней, с интервалом приблизительно 25 дней, с интервалом приблизительно 30 дней, с интервалом приблизительно 35 дней, с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 50 дней, с интервалом приблизительно 55 дней, с интервалом приблизительно 60 дней или с интервалом приблизительно 65 дней. Преимущественно дозы вводятся с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 41 день, с интервалом приблизительно 42 дня, с интервалом приблизительно 43 дня, с интервалом приблизительно 44 дня, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 46 дней, с интервалом приблизительно 47 дней, с интервалом приблизительно 48 дней, с интервалом приблизительно 49 дней или с интервалом приблизительно 50 дней. Согласно определенным вариантам осуществления первичная

доза и бустерная доза вводятся с интервалом приблизительно 1 неделя, с интервалом приблизительно 2 недели, с интервалом приблизительно 3 недели, с интервалом приблизительно 4 недели, с интервалом приблизительно 5 недель, с интервалом приблизительно 6 недель, с интервалом приблизительно 7 недель, с интервалом приблизительно 8 недель, с интервалом приблизительно 9 недель, с интервалом приблизительно 10 недель, с интервалом приблизительно 11 недель или с интервалом приблизительно 12 недель. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первичная доза и бустерная доза вводятся с интервалом приблизительно 1 месяц, с интервалом приблизительно 2 месяца, с интервалом приблизительно 3 месяца, с интервалом приблизительно 4 месяца, с интервалом приблизительно 5 месяцев, с интервалом приблизительно 6 месяцев, с интервалом приблизительно 7 месяцев, с интервалом приблизительно 8 месяцев, с интервалом приблизительно 9 месяцев, с интервалом приблизительно 10 месяцев, с интервалом приблизительно 11 месяцев или с интервалом приблизительно 12 месяцев.

[00125] Согласно определенным вариантам осуществления способы предусматривают введение первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; или введение второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток антигена или иммуногена, и введение отдельно третьей композиции, содержащей иммуномодулятор. Согласно вариантам осуществления иммуномодулятор выбран из антииммуносупрессора или иммуноактиватора. Иммуномодулятор усиливает клеточно-опосредованный иммунный ответ, индуцированный первой и/или второй композицией.

[00126] Согласно вариантам осуществления первая или вторая композиция вакцин вводится в виде первичной и бустерной дозы, вводимой с интервалом по меньшей мере 7 дней, с интервалом по меньшей мере 14 дней или дольше. Согласно вариантам осуществления первичная доза и бустерная доза вводятся с интервалом приблизительно 7 дней, с интервалом приблизительно 14 дней, с интервалом приблизительно 20 дней, с интервалом приблизительно 25 дней, с интервалом приблизительно 30 дней, с интервалом приблизительно 35 дней, с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 50 дней, с интервалом приблизительно 55 дней, с интервалом приблизительно 60 дней или с интервалом

приблизительно 65 дней. Преимущественно дозы вводят с интервалом приблизительно 40 дней, с интервалом приблизительно 41 день, с интервалом приблизительно 42 дня, с интервалом приблизительно 43 дня, с интервалом приблизительно 44 дня, с интервалом приблизительно 45 дней, с интервалом приблизительно 46 дней, с интервалом приблизительно 47 дней, с интервалом приблизительно 48 дней, с интервалом приблизительно 49 дней или с интервалом приблизительно 50 дней. Согласно определенным вариантам осуществления первичная доза и бустерная доза вводятся с интервалом приблизительно 1 неделя, с интервалом приблизительно 2 недели, с интервалом приблизительно 3 недели, с интервалом приблизительно 4 недели, с интервалом приблизительно 5 недель, с интервалом приблизительно 6 недель, с интервалом приблизительно 7 недель, с интервалом приблизительно 8 недель, с интервалом приблизительно 9 недель, с интервалом приблизительно 10 недель, с интервалом приблизительно 11 недель или с интервалом приблизительно 12 недель. Согласно некоторым другим вариантам осуществления первичная доза и бустерная доза вводятся с интервалом приблизительно 1 месяц, с интервалом приблизительно 2 месяца, с интервалом приблизительно 3 месяца, с интервалом приблизительно 4 месяца, с интервалом приблизительно 5 месяцев, с интервалом приблизительно 6 месяцев, с интервалом приблизительно 7 месяцев, с интервалом приблизительно 8 месяцев, с интервалом приблизительно 9 месяцев, с интервалом приблизительно 10 месяцев, с интервалом приблизительно 11 месяцев или с интервалом приблизительно 12 месяцев.

[00127] Согласно вариантам осуществления третью композицию, иммуномодулятор, вводят в те же дни, что и первую или вторую композиции вакцин. Согласно вариантам осуществления третью композицию вводят несколько дней, по меньшей мере два дня, по меньшей мере три дня, по меньшей мере четыре дня, по меньшей мере пять дней или по меньшей мере шесть дней. Согласно вариантам осуществления третью композицию вводят по меньшей мере один раз между первичной и бустерной дозой первой или второй композиции вакцин и по меньшей мере один раз после бустерной дозы первой или второй комбинации вакцин. Согласно иллюстративным вариантам осуществления третью композицию вводят на 4, 7, 11, 15, 18 и 22 день после введения первичной дозы первой или второй композиции вакцин.

[00128] Согласно вариантам осуществления комбинацию вакцин вводят нуждающемуся в этом субъекту. Согласно вариантам осуществления нуждающийся в этом субъект представляет собой позвоночное животное, такое как млекопитающее, птица, рептилия, амфибия или рыба. Согласно определенным вариантам осуществления субъект представляет собой человека, компаньона, одомашненное, производящее пищу или корм

животное, домашний скот, дичь, гоночное или спортивное животное, такое как корова, собака, кошка, коза, овца или свинья или лошадь, или даже птица, такая как индейка, утка или курица. Согласно определенным вариантам осуществления позвоночное животное представляет собой человека.

[00129] В контексте настоящего описания иммунологически эффективное количество представляет собой количество или концентрацию композиций комбинации вакцин, которые при введении нуждающемуся в этом субъекту вызывают иммунный ответ на доставленный антиген. Согласно определенным вариантам осуществления иммунологически эффективное количество комбинации вакцин или композиций вакцин вызывает антигенспецифический ответ CD8⁺ Т-клеток.

[00130] Способы по настоящему изобретению можно подходящим образом применять для предотвращения заболеваний в качестве профилактической вакцинации или лечения заболеваний в качестве терапевтической вакцинации. Комбинацию вакцин по настоящему изобретению можно вводить нуждающемуся в этом субъекту либо отдельно в качестве первичной дозы и бустерной дозы, либо в сочетании с композицией иммунного ингибитора. Кроме того, комбинацию вакцин по настоящему изобретению можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в виде первичной дозы или бустерной дозы в комбинации с композицией иммунного ингибитора. Композиция иммуномодулятора представляет собой третью отдельную композицию комбинации вакцин и может вводиться в тот же день и время, что и первая композиция вакцины и/или вторая композиция вакцины, или в другой день. Согласно иллюстративным вариантам осуществления композицию иммуномодулятора вводят после первой композиции вакцины.

[00131] Согласно определенным вариантам осуществления комбинацию вакцин вводят нуждающемуся в этом субъекту для применения при лечении или профилактики рака. Согласно вариантам осуществления комбинацию вакцин применяют в качестве терапевтического или профилактического средства для пациентов с немелкоклеточным раком легких, раком молочной железы, раком печени, раком головного мозга, раком желудка, раком поджелудочной железы, раком почки, раком яичников, раком миеломой, острым миелогенным лейкозом, хроническим миелолейкозом, раком головы и шеи, колоректальным раком, раком почек, раком пищевода, раком кожи меланомой и/или раком предстательной железы. Эти раковые клетки могут экспрессировать неоантигены или вирусные антигены, и вакцинные композиции будут содержать соответствующие полипептиды, содержащие один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток, в зависимости от биологии конкретного рака/опухоли.

[00132] Согласно определенным вариантам осуществления комбинация вакцин вводится нуждающемуся в этом субъекту для применения при лечении или профилактике хронической инфекции. Согласно вариантам осуществления комбинация вакцин используется в качестве терапевтического или профилактического средства либо для индивидуумов с хронической инфекцией, либо для индивидуумов, подверженных риску воздействия патогенов, вызывающих хронические инфекции. Такие патогены включают в себя, без ограничения, вирусы HIV, гепатита В и D, герпесвирусы, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус и человеческий Т-лимфотропный вирус типа III.

[00133] Комбинацию вакцин можно вводить человеку или животному *in vivo* с использованием множества известных путей и способов. Например, композиции комбинации вакцин могут быть представлены в виде раствора, суспензии или эмульсии для инъекций и вводиться парентерально, подкожно, перорально, эпидермально, внутрикожно, внутримышечно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутривенно с использованием обычной иглы и шприца или с использованием системы впрыска струи жидкости. Композицию комбинации вакцин можно вводить местно на кожу или ткань слизистой оболочки, например, назально, интратрахеально, кишечно, сублингвально, ректально или вагинально, или в виде высокодисперсного спрея, такого как аэрозоль, подходящего для респираторного или легочного введения. Согласно определенным вариантам осуществления вакцинные композиции вводятся внутримышечно.

[00134] Композиции комбинации вакцин можно вводить субъекту в количестве, совместимом с дозированной композицией, которая будет профилактически и/или терапевтически эффективной. Введение композиции по настоящему изобретению может быть либо с «профилактической», либо с «терапевтической» целью. Используемый в настоящем документе термин «терапевтический» или «лечение» включает в себя любое одно или более из следующего: предупреждение инфекции; лечение хронической инфекции; предотвращение онкогенеза/канцерогенеза; уменьшение или устранение симптомов и/или уменьшение или полное устранение опухоли или рака.

[00135] Согласно вариантам осуществления комбинация вакцин включает в себя раковые антигены или вирусные антигены, ассоциированные с раком, причем лечение может быть профилактическим (до подтвержденного диагноза рака) или терапевтическим (после диагностики рака). Терапевтическое лечение может проводиться при раке I, II, III или IV стадии, до или после хирургического вмешательства. Лечение может представлять собой послеоперационное поддерживающее лечение или долгосрочное лечение для улучшения выживаемости без прогрессирования заболевания или общей выживаемости и/или исчезновения заболевания.

[00136] Выбор носителя, если требуется, часто зависит от пути доставки композиции. В рамках настоящего изобретения композиции могут быть составлены для любого подходящего пути и способа введения. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители включают в себя те, которые используются в композициях, подходящих для перорального, глазного, ректального, назального, местного (включая в себя буккальное и сублингвальное), вагинального или парентерального (включая в себя подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутрикожное, трансдермальное) введения.

[00137] Композиции можно вводить в любой подходящей форме, например в виде жидкости, твердого вещества или аэрозоля. Например, пероральные составы могут иметь форму эмульсий, сиропов или растворов, таблеток или капсул, которые могут быть покрыты энтеросолюбильным покрытием для защиты активного компонента от разложения в желудке. Назальные составы могут представлять собой спреи, аэрозоли или растворы. Составы для трансдермального введения могут быть адаптированы для их конкретной системы доставки и могут включать в себя пластыри. Составы для инъекций могут представлять собой растворы или суспензии в дистиллированной воде или другом фармацевтически приемлемом растворителе или суспендирующем средстве.

[00138] Подходящая дозировка профилактической или терапевтической вакцины для введения пациенту будет определяться в клинике. Для достижения иммунологического или клинического эффекта могут потребоваться многократные дозы, помимо исходной первичной и бустерной дозы, которые, если требуется, как правило, вводят с интервалом от 1 до 12 недель. Если требуется усиление иммунного ответа в течение более длительных периодов времени, могут применяться повторные дозы с интервалом от 1 месяца до 5 лет.

ПРИМЕРЫ

[00139] Следующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить специалистам в настоящей области техники полное раскрытие и описание того, как использовать варианты осуществления, представленные в настоящем документе, и не предназначены ни для ограничения объема настоящего раскрытия, ни для представления того, что приведенные ниже примеры представляют собой все эксперименты или только выполненные эксперименты. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по объему, а температура дана в градусах Цельсия. Следует

понимать, что изменения в описанных способах могут быть сделаны без изменения фундаментальных аспектов, для иллюстрации которых предназначены примеры.

[00140] Пример 1: Получение комбинации вакцин, содержащей гетерологичную комбинацию первичной и бустерной доз: первая композиция (композиция нереплицирующегося вирусного вектора) и вторая композиция (композиция связанного с фторуглеродом пептида)

[00141] *Композиция нереплицирующегося вирусного вектора*

[00142] AdGP70 был разработан как вектор рекомбинантного аденовируса серотипа 5, репликация которого была нарушена за счет делеции E1 и E3 ($\Delta E1E3$) и обеспечивалась экспрессия GP70 (белка оболочки (Env) вируса лейкоза мышей - MuLV - номер доступа GenBank ABC94931.1) под промотором цитомегаловируса (CMV). Сначала получали челночную плазмиду после клонирования химически синтезированного, оптимизированного по кодонам гена GP70 для экспрессии в клетках млекопитающих в сайты рестрикции HindIII/XbaI челночного вектора pAdHighy (Altimune Inc) в Genscript (Piscataway, NJ). Рекомбинацию между содержащим трансген челночным вектором pAdHighy и плазмидой остова аденовируса 5 pAdEasy-1 проводили в штамме E. coli BJ5183 в условиях селекции канамицина для производства геномной плазмиды pAdGP70. Плазида pAdEasy-1 содержит все последовательности Ad5, за исключением нуклеотидов 1–3533 (охватывающих гены E1) и 28130–30820 нуклеотидов (охватывающих E3). Выбранную геномную плазмиду pAdGP70 повторно трансформировали в клетки штамма DH10B E.coli при селекции канамицина путем выделения колонии. Выбранную колонию pAdGP70 амплифицировали и очищали. Посевной материал рекомбинантного аденовирусного вектора AdGP70 получали путем трансфекции линейаризованной очищенной геномной плазмиды pAdGP70 PacI в линии упаковывающих аденовирус клеток HEK293. Вектор AdGP70 размножали на клетках HEK293 и очищали ультрацентрифугированием в градиенте хлорида цезия. Очищенные векторы Ad5 стерилизовали фильтрацией с размером пор 0,22 мкм и хранили при температуре -80°C в буфере для хранения аденовирусов A195. Титр AdGP70 (4×10^{11} мкЕ/мл) определяли с использованием набора для быстрого титрования Adeno-X (Clontech, Mountain View, CA) на клетках HEK293. Перед введением *in vivo* AdGP70 дополнительно разводили в PBS до 4×10^{10} МЕ/мл.

[00111] SEQ ID NO. 1: Последовательность белка GP70 вируса лейкоза мышей - номер доступа ABC94931.1.

[00112] MDTRRPRQGSDHTPDKTIMESTTLSPFKNQVNPWGPLICVLLILGGVNPV
ALGNSPHQVFNLSEVTNGDRETVWAITGNHPLWTWWPDLTPDLCMLALHGPFSPPPG

PPCCSGSSDSTPGCSRDCCEPLTSYTPRCNTAWNRLKLSKVTHAHNEGFYVCPGPHRPR
 WARSCGGPESFYCASWGCETTGRASWKPSSSWDYITVSNNLTSDQATPVCKGNEWCNS
 LTIRFTSFGKQATSWVTGHWGLRLYVSGHDPGLIFGIRLKITDSGPRVPIGPNPVLSDR
 RPPSRPRPTRSPPPSNSTPTETPLTLPEPPPAGVENRLLNLVKGAYQALNLTPDKTQECW
 LCLVSGPPYYEGVAVLGTYSNHTSAPANCSVASQHKLTLSSEVTGQGLCIGAVPKTHQVL
 CNTTQKTS DGSYYLAAPTGTWACSTGLTPCISTTILDLTTDYCVLVELWPRVTYHSPSY
VYHQFERRAKYKREPVSLTLALLLGGLTMGGIAAGVGTGTTALVATQQFQQQLQAAMH
 DDLKEVEKSITNLEKSLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYADHTGLV
 RDSMAKLRERLSQRQKLFESQQGWFEGLFNKSPWFTTLLISTIMGPLIILLLILFGPCILNR
LVQFIKDRISVVQALVLTQQYHQLKTIGDCKSRE

[00113] Т-клеточные эпитопы, присутствующие в антигене, можно идентифицировать с использованием различных способов, включая в себя опубликованные эпитопы, искусственную нейронную сеть (ANN) или способ стабилизированного матрикса (SMM) (с использованием базы данных иммунных эпитопов и веб-сайта ресурсов анализа) или веб-сайта SYFPEITHI, который представляет собой базу данных, содержащую более 7000 пептидных последовательностей, которые, как известно, связывают молекулы МНС класса I и класса II, соответствует опубликованным отчетам. Эпитопы Т-клеток из GP70 идентифицировали путем прогнозирования пептидов с высокой аффинностью связывания для мышиных молекул МНС класса I и класса II (H-2Kd, H-2Dd, H-2Ld, IAd и IEd) с использованием искусственной нейронной сети (ANN) и способа стабилизированного матрикса (SMM) с использованием прогнозируемого отсечения $IC_{50} < 50$ нМ и SYFPEITHI с использованием порога > 20 (<http://www.syfpeithi.de/>). В таблице 1 представлены Т-клеточные эпитопы последовательности белка GP70, идентифицированные с использованием комбинации этих способов.

[00114] Таблица 1: Т-клеточные эпитопы GP70

Последовательность	Положение N-конца	Положение C-конца	Способ	МНС-рестрикция (CD4/CD8)	Аллель	Аффинность связывания (нМ) или показатель
VNPWGPLIVLLILGG SEQ ID NO: 2	32	46	SYFPEITHI	CD4	IAd	23
NPWGPLIVL SEQ ID NO: 3	33	41	SYFPEITHI	CD8	Ld	22
PWGPLIVLLILGGVN SEQ ID NO: 4	34	48	SYFPEITHI	CD4	IAd	20
GPLIVLLIL SEQ ID NO: 5	36	44	SYFPEITHI	CD8	Ld	22
GPLIVLLILGGVNPV SEQ ID NO: 6	36	50	SYFPEITHI	CD4	IAd	21
LGGVNPVALGNSPHQ SEQ ID NO: 7	44	58	SYFPEITHI	CD4	IAd	27
NSPHQVFNL SEQ ID NO: 8	54	62	SYFPEITHI	CD8	Ld	22
NLSWEVTNGDRETVW SEQ ID NO: 9	61	75	SYFPEITHI	CD4	IEd	20
NGDRETVWAIIGNHP SEQ ID NO: 10	68	82	SYFPEITHI	CD4	IAd	24

TPDLCMLAL SEQ ID NO: 11	91	99	SYFPEITHI	CD8	Ld	22	GP70- 142
SYWGLEYRA SEQ ID NO: 12	103	111	SYFPEITHI	CD8	Kd	22	
SYTPRCNTA SEQ ID NO: 13	142	150	ANN	CD8	Kd	25,22hM	
SYTPRCNTA SEQ ID NO: 13	142	150	SYFPEITHI	CD8	Kd	22	
RCNTAWNRLKLSKVT SEQ ID NO: 14	146	160	SYFPEITHI	CD4	IAd	20	
NTAWNRLKLSKVTHA SEQ ID NO: 15	148	162	SYFPEITHI	CD4	IAd	21	
NTAWNRLKLSKVTHA SEQ ID NO: 15	148	162	SYFPEITHI	CD4	IEd	20	
WNRLKLSKVTHAHNE SEQ ID NO: 16	151	165	SYFPEITHI	CD4	IAd	20	
NEGFYVCPGPHRPRW SEQ ID NO: 17	164	178	SYFPEITHI	CD4	IEd	20	
RSCGGPESF SEQ ID NO: 18	180	188	SYFPEITHI	CD8	Ld	21	GP70- 196
CETTGRASWKPSSSW SEQ ID NO: 19	196	210	SYFPEITHI	CD4	IAd	22	
KPSSSWDYI SEQ ID NO: 20	204	212	SYFPEITHI	CD8	Ld	20	
DYITVSNNL SEQ ID NO: 21	210	218	ANN	CD8	Kd	33,91hM	
DYITVSNNL SEQ ID NO: 21	210	218	SMM	CD8	Kd	46,55hM	
DYITVSNNL SEQ ID NO: 21	210	218	SYFPEITHI	CD8	Kd	24	
ITVSNNLTSDQATPV SEQ ID NO: 22	212	226	SYFPEITHI	CD4	IAd	22	
TGHHWWGLRLYVSGHD SEQ ID NO: 23	252	266	SYFPEITHI	CD4	IAd	25	
LYVSGHDPG SEQ ID NO: 24	260	268	SYFPEITHI	CD8	Kd	22	
VPIGPNPVL SEQ ID NO: 25	284	292	ANN	CD8	Ld	38,04hM	
VPIGPNPVL SEQ ID NO: 25	284	292	SYFPEITHI	CD8	Ld	21	
NPVLSDRRPPSRPRP SEQ ID NO: 26	289	303	SYFPEITHI	CD4	IEd	20	
NSTPTETPL SEQ ID NO: 27	311	319	SYFPEITHI	CD8	Ld	21	
TPTETPLTL SEQ ID NO: 28	313	321	SYFPEITHI	CD8	Ld	21	
PPAGVENRL SEQ ID NO: 29	325	333	SYFPEITHI	CD8	Ld	21	
KTQECWLCLVSGPPY SEQ ID NO: 30	351	366	SYFPEITHI	CD4	IAd	23	
PPIYEGVAVLGTYSN SEQ ID NO: 31	363	377	SYFPEITHI	CD4	IAd	22	
PYIEGVAVL SEQ ID NO: 32	364	372	SYFPEITHI	CD8	Kd	21	
YSNHTSAPANCVAS SEQ ID NO: 33	375	389	SYFPEITHI	CD4	IAd	29	
NHTSAPANCVASQH SEQ ID NO: 34	377	391	SYFPEITHI	CD4	IAd	22	
CSVASQHKL SEQ ID NO: 35	385	393	SYFPEITHI	CD8	Ld	21	GP70- 472
VASQHKLTLSEVTGQ SEQ ID NO: 36	387	401	SYFPEITHI	CD4	IAd	20	
SDGSYYLAAPTGTW SEQ ID NO: 37	422	436	SYFPEITHI	CD4	IAd	28	
WACSTGLTPCISTTI SEQ ID NO: 38	437	451	SYFPEITHI	CD4	IAd	22	
TPCISTTIL SEQ ID NO: 39	444	452	SYFPEITHI	CD8	Ld	22	
SPSYVYHQF SEQ ID NO: 40	472	480	ANN	CD8	Ld	30,26hM	
SPSYVYHQF SEQ ID NO: 40	472	480	SYFPEITHI	CD8	Ld	22	
SPSYVYHQFERRAKY SEQ ID NO: 41	472	486	SYFPEITHI	CD4	IEd	26	
YHQFERRAKYKREPV SEQ ID NO: 42	477	491	SYFPEITHI	CD4	IEd	32	
KYKREPVSL SEQ ID NO: 43	485	493	SYFPEITHI	CD8	Kd	25	

KYKREPVSLLTALLL SEQ ID NO: 44	485	499	SYFPEITHI	CD4	IAd	24
EPVSLTLAL SEQ ID NO: 45	489	497	SYFPEITHI	CD8	Ld	21
EPVSLTLALLLGGIT SEQ ID NO: 46	489	503	SYFPEITHI	CD4	IAd	24
PVSLTLALLLGGITM SEQ ID NO: 47	490	504	SYFPEITHI	CD4	IAd	22
VSLTLALLLGGITMG SEQ ID NO: 48	491	505	SYFPEITHI	CD4	IAd	24
GLTMGGIAAGVGTGT SEQ ID NO: 49	501	515	SYFPEITHI	CD4	IAd	26
GTGTTALVATQQFQQ SEQ ID NO: 50	512	526	SYFPEITHI	CD4	IAd	22
TNLEKSLTS SEQ ID NO: 51	543	551	SYFPEITHI	CD8	Kd	21
RRGLDLLFLKEGGLC SEQ ID NO: 52	560	574	SYFPEITHI	CD4	IAd	22
LKEECCLYADHTGLV SEQ ID NO: 53	577	591	SYFPEITHI	CD4	IAd	21
CCLYADHTGLVRDSM SEQ ID NO: 54	581	595	SYFPEITHI	CD4	IEd	20
LYADHTGLV SEQ ID NO: 55	583	591	SYFPEITHI	CD8	Kd	21
ADHTGLVRDSMAKLR SEQ ID NO: 56	585	599	SYFPEITHI	CD4	IAd	24
RDSMAKLRERLSQRQ SEQ ID NO: 57	592	606	SYFPEITHI	CD4	IAd	20
MAKLRERLSQRQKLF SEQ ID NO: 58	595	609	SYFPEITHI	CD4	IEd	20
ERLSQRQKLFESQGG SEQ ID NO: 59	600	614	SYFPEITHI	CD4	IAd	20
WFTTLISTI SEQ ID NO: 60	625	633	ANN	CD8	Kd	6,17нМ
WFTTLISTI SEQ ID NO: 60	625	633	SMM	CD8	Kd	44,68нМ
WFTTLISTI SEQ ID NO: 60	625	633	SYFPEITHI	CD8	Kd	21
MGPLIILLILLIFGP SEQ ID NO: 61	634	648	SYFPEITHI	CD4	IAd	22
PLIILLILLIFGPCI SEQ ID NO: 62	636	650	SYFPEITHI	CD4	IAd	21
ILLFGPCILNRLVQF SEQ ID NO: 63	643	657	SYFPEITHI	CD4	IEd	20
LVQFIKDRISVVQA SEQ ID NO: 64	654	667	Casares N. et al *	CD4	H2d класс II	Не определены
QFIKDRISVVQALVL SEQ ID NO: 65	656	670	SYFPEITHI	CD4	IAd	24
KDRISVVQALVLTQQ SEQ ID NO: 66	659	673	SYFPEITHI	CD4	IAd	27
ISVVQALVL SEQ ID NO: 67	662	670	SYFPEITHI	CD8	Ld	20

[00115] N Casares; J J Lasarte; A L de Cerio; P Sarobe; M Ruiz; I Melero; J Prieto; F Borrás-Cuesta. Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity. 2001. Eur J Immunol. 31: 1780-9.

[00116] *Композиция связанного с фторуглеродом пептида*

[00117] Композиция связанного с фторуглеродом пептида (PepGP70) содержит четыре модифицированных фторуглеродом пептида (GP70-142, GP70-196, GP70-472, GP70-СМ), полученных из GP70, белка оболочки (Env) вируса лейкоза мышей (MuLV). Последовательности GP-70-142, GP70-196, GP70-472, GP70-СМ представлены в таблице 1 и таблице 2. Четыре пептида были выбраны на основе предсказания пептидов с высокой аффинностью связывания для мышиных молекул МНС класса I и класса II (H-2Kd, H-2Dd, H-2Ld, IAd и IEd) с использованием искусственной нейронной сети (ANN) и способа

стабилизированной матрицы (SMM) с использованием прогнозируемого отсечения IC50 <50 нм (www.iedb.org/) и SYFPEITHI с использованием порогового значения >20 (www.syfpeithi.de/) и опубликованной информации. GP70-142, GP70-196, GP70-472, GP70-CM получали твердофазным пептидным синтезом (SPPS). Все пептиды были синтезированы компанией American Peptide Company (Sunnyvale, CA), создавая пептид на смоле с использованием стандартной химии 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc). Включение фторуглеродной цепи 2H,2H,3H,3H-перфторандекановой кислоты ($C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$) в эпсилон-цепь селективно незащищенного C- или N-концевого дополнительного лизина для получения модифицированных фторуглеродом пептидов. После расщепления и удаления защитных групп боковой цепи неочищенные пептиды осаждали из холодного эфира и собирали фильтрованием. Чистоту оценивали способом RP-HPLC, и она превышала 90% для всех пептидов. Сублимированные связанные с фторуглеродом пептиды хранили при температуре -20°C. PepGP70 получали после солюбилизации пептидов GP-70-142, GP70-196, GP70-472, GP70-CM, смешивания, добавления раствора маннитол/вода, фильтрации с использованием фильтра с диаметром пор 0,22 мкм и сублимационной сушки для создания отдельных флаконов, содержащих 1400 мкг на пептид. Лиофилизированные PepGP70 хранили при температуре -20°C. Перед введением *in vivo* флаконы с лиофилизированными PepGP70 восстанавливали 1,4 мл 28 мМ L-гистидина, содержащего ODN1585 (агонист TLR 9; Invivogen, Тулуза, Франция), что приводило к концентрации 100 мкг/ODN1585/мл и 1000 мкг/пептид/мл.

[00118] Таблица 2: Четыре пептида композиции PepGP70

Название	Последовательность
GP70-142	SYTPRCNTAWNRLKLSKVTHAHNE(K)FA ₁ (SEQ ID NO: 68)
GP70-196	FA ₁ (K)ETTGRASWKPSSSWDYITVSNLTSQATPVKKK (SEQ ID NO: 69)
GP70-472	SPSYVYHGFERRAKYKREPVSLLALLGLTMGKKK(K)FA ₁ (SEQ ID NO: 70)
GP70-CM	SPSYVYHGFKKKLVSQFIKDRISVVQA(K)FA ₁ (SEQ ID NO: 71)

[00119] FA₁=C₈F₁₇(CH₂)₂-CO-

[00120] Вышеуказанные пептиды, полученные из последовательности белка GP70, подчеркнуты в приведенной выше полноразмерной последовательности белка (SEQ ID NO: 1) и эпитопы Т-клеток идентифицированы в таблице 1. GP70-472 и GP70-CM содержат эпитоп цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) SPSYVYHGF (SEQ ID NO: 72) (также обозначаемый в декстрамере как AH1). KKK представляет собой линкер и не присутствует

в полноразмерной последовательности белка GP70. GP70-СМ представляет собой химерный пептид, содержащий эпитоп CTL (эпитоп CD8+), линкер ККК и эпитоп Т-хелперных лимфоцитов (HTL).

[00121] Соответственно, в настоящем документе представлена комбинация вакцин для гетерологичной прайм-буст схемы введения, причем комбинация содержит первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; и вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8+ Т-клеток антигена или иммуногена в первой композиции; причем либо первая, либо вторая композиция представляет собой первичную композицию или бустерную композицию.

[00143] Пример 2: Получение комбинации вакцин, содержащей комбинацию композиции Т-клеточной вакцины и композиции иммуномодулятора: первая композиция (композиция нереплицирующегося вирусного вектора) или вторая композиция (композиция связанного с фторуглеродом пептида); и третья композиция (композиция иммунного модулятора)

[00122] Композицию нереплицирующегося вирусного вектора (первая композиция) и композицию связанного с фторуглеродом пептида (вторая композиция) готовили, как описано в примере 1.

[00123] *Композиция иммуномодулятора*

[00124] Композиции иммуномодулятора могут представлять собой любые из тех, что описаны в настоящем документе и представлены в соответствующем водном растворе. В данном примере анти-PD-1 был представлен в PBS и, как раскрыто ниже, вводился отдельно и в другой момент времени от любой из первой или второй композиций вакцин, описанных выше.

[00125] Соответственно, в настоящем документе представлена комбинация вакцин для применения для индукции ответа CD8+ Т-клеток и уменьшения размера опухоли, причем комбинация содержит первую композицию, содержащую нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; или вторую композицию, содержащую мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более

эпитопов CD8+ Т-клеток антигена или иммуногена; и третью композицию, содержащую иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора. Первую или вторую композицию вводят отдельно от третьей композиции.

[00126] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе представлены комбинации вакцин, содержащие от двух до трех композиций, выбранных из: а) первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; б) второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8+ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена; и с) третьей композиции, содержащей иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора, причем, когда выбраны первая композиция и вторая композиция, либо первая, либо вторая композиция представляет собой первичную композицию или бустерную композицию.

[00127] Пример 3: Индуцирование антигенспецифического ответа CD8+ Т-клеток с использованием композиции нереплицирующегося вирусного вектора и композиции связанного с фторуглеродом пептида; гетерологичная комбинация вакцин

[00128] Получение AdGP70 (композиция невирусного вектора) и PepGP70 (композиция связанного с фторуглеродом пептида) раскрыто в примере 1, причем AdGP70 представляет собой дефицитный по репликации аденовирусный вектор, экспрессирующий GP70 (SEQ ID NO: 1), а PepGP70 представляет собой комбинацию четырех пептидов (SEQ ID NO: 68-71), индивидуально присоединенных к фторуглеродной цепи и присутствующих в мицеллах.

[00129] Было проведено сравнение гомологичного прайм/буст дозирования и гетерологичного прайм/буст дозирования композиций AdGP70 и PepGP70, причем иммуногенность композиций AdGP70 и PepGP70 после одного или двух введений мышам BALB/c сравнивали с гетерологичными прайм/буст комбинациями AdGP70 и PepGP70. Мышей иммунизировали подкожным путем с интервалом 14 дней между введением первичной дозы и введением бустерной дозы. Группа 1 (n=8) получала 50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 0. Группа 2 (n=8) получала 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) подкожно в день 0. Группа 3 (n=8) получала 50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 0 и день 14. Группа 4 (n=8) получала 50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день

0 и день 14. Группа 5 (n=8) получала 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) и PepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 0 и день 14, соответственно. Группа 6 (n=8) получала 50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) и AdGP70 (2×10^9 ifu) подкожно в день 1 и день 14, соответственно. Через 10 дней после последнего введения (измерение на 24 день) клетки селезенки от каждого животного выделяли и процессировали с помощью двух типов иммуноанализов: (1) анализ *in vitro* IFN- γ ELISpot для оценки частоты GP70-специфических Т-клеток в отдельных животных (фиг. 1) и (2) анализ окрашивания декстрамера с помощью проточной цитометрии для измерения частоты CD8⁺ Т-клеток, специфических для H-2Ld-ограниченного эпитопа, полученного из gp70 (пептид AH1, последовательность SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 72)). Смотрите фиг. 1 и 2.

[00130] Клинические испытания продемонстрировали эффективность вакцин, индуцирующих Т-клетки, против ряда заболеваний, и, хотя могут быть использованы многие подходы для оценки защитных Т-клеточных ответов, анализ ELISpot стал признанным наиболее подходящим средством определения иммуногенности вакцины. Slota M. et al., ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. Expert Rev Vaccines 2011;10(3):299-306. Для анализа IFN- γ ELISpot планшеты ELISpot (MSIPS4510 Merck Millipore) предварительно покрывали 100 мкл/лунку улавливающего IFN- γ антитела, разведенного в PBS в концентрации 5 мкг/мл (пара ELISPOT мышинных IFN γ , BD, ссылка 551881) в асептических условиях и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Покрывающее антитело удаляли, планшеты промывали, затем инкубировали 2 часа при комнатной температуре с 200 мкл/лунку полной культуральной среды, состоящей из RPMI Glutamax 1640 (GIBCO, ссылка 11548876) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (GIBCO, ссылка 10270-098) и 1% раствора пенициллин-стрептомицина (GIBCO, ссылка 11548876). После удаления среды суспензии клеток селезенки в полной культуральной среде добавляли в концентрации 5×10^5 клеток на лунку в предварительно покрытые планшеты ELISpot в присутствии либо 10 мкг/мл каждого индивидуального пептида (GP70-142, GP70-196, GP70-472, GP70-CM), либо смеси четырех пептидов, конканавалина А в качестве положительного контроля (eBiosciences, ссылка 00-4978-03) в объеме 200 мкл на лунку. В качестве отрицательного контроля использовали только среду. Каждое условие исследования выполняли в двух экземплярах. Планшеты инкубировали 18 часов при температуре 37°C, 5% CO₂ в увлажненной среде. После двух стадий промывки деионизированной водой (DI) для полного удаления клеток планшеты тщательно промывали промывочным буфером ELISpot (1-кратный PBS Дульбекко, Gibco, Fisher № в каталоге 11540486), 0,05% Tween®20 Fisher № в каталоге 10113103). Затем планшеты ELISpot инкубировали 2 часа при комнатной температуре со 100 мкл/лунку

идентифицирующего антитела к IFN- γ (пара ELISPOT Mouse IFN γ , BD, ссылка 551881), разведенного в PBS с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки в концентрации 2 мкг/мл. Раствор идентифицирующих антител отбирали, и планшеты промывали промывочным буфером для ELISpot перед тем, как инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре со 100 мкл/лунку разведенного раствора стрептавидин-HRP (BD™ ELISPOT Streptavidin-HRP, № в каталоге 557630). Раствор стрептавидин-HRP удаляли и планшеты промывали промывочным буфером для ELISpot. В каждую лунку добавляли 100 мкл конечного раствора субстрата (AEC). За развитием пятен наблюдали в течение 15-20 минут, и реакцию субстрата останавливали промыванием лунок деионизированной водой. Затем планшеты сушили на воздухе в течение ночи при комнатной температуре в темноте. Подсчет пятен выполняли с использованием анализатора ELISPOT: планшет-ридер ImmunoSpot® ELISpot (CTL - Europe GmbH, Германия). Клетки, образующие пятно, SFC/лунку, подсчитывали для количественного определения количества клеток, производящих IFN- γ в ответ на специфический стимул.

[00131] Смотрите фиг. 1, на которой показаны кумулятивные ответы ELISpot IFN- γ на четыре пептида, выраженные как количество клеток, производящих IFN- γ (пятнообразующие клетки, SFC) на миллион клеток селезенки, рассчитанное для каждой группы на 24 день после получения первичной дозы. Группы 5 и 6 представляют собой гетерологичные прайм-буст группы, демонстрирующие синергистический эффект по сравнению с гомологичными прайм-буст группами.

[00132] Для анализа декстрамера клетки селезенки мыши окрашивали декстрамером H-2 Ld, приготовленным с пептидом AH1 (эпитоп CD8⁺ Т-клеток, полученный из GP70, последовательность: SPSYVYHQF (**SEQ ID NO: 73**)), или нерелевантным контрольным декстрамером H-2 Ld, полученным с пептидом NP118-126 (эпитоп CD8⁺ Т-клеток, полученный из нуклеопротеина LCMV, последовательность: RPQASGVYM (**SEQ ID NO: 74**)), оба меченные фикоэритрином (PE). Реагенты декстрамера состоят из основной цепи декстранового полимера, несущей оптимизированное количество комплексов МНС-пептид и флуорохромов, что дает возможность обнаруживать антигенспецифические Т-клетки с рецептором Т-клеток, специфически распознающим комплекс МНС/пептид, переносимый декстрановым полимером. Процесс окрашивания клеток для анализа посредством проточной цитометрии описывается следующим образом. Отдельные клетки селезенки от 1 до 6 животных (1×10^6 клеток) культивировали в 200 мкл полной культуральной среды, состоящей из RPMI Glutamax 1640 (GIBCO, ссылка 11548876) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (GIBCO, ссылка 10270-098) и 1% раствора пенициллин-стрептомицина (GIBCO, ссылка 11548876) в 96-луночных планшетах. Планшеты

инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, 5% CO₂ в увлажненной среде. После инкубации клетки селезенки от отдельных мышей объединяли по группам и промывали буфером для окрашивания (DPBS1X с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ ЭДТА и 1% раствора пенициллин-стрептомицина) центрифугированием в течение 6 мин при 1300 об/мин при температуре 4°C. Рецепторы Fc блокировали путем инкубации клеток селезенки в течение 10 минут при температуре 4°C с 25 мкл буфера для холодного окрашивания, содержащего антитело к CD16/32 мыши, разведенное до 1:200. Затем клетки окрашивали либо соответствующим декстрамером AH-1/H-2 Ld (Immudex, ссылка JG3294-OPT), либо нерелевантным декстрамером NP118-126/H-2 Ld (Immudex, ссылка JG2750-OPT). 25 мкл соответствующего предварительно разведенного 1:2,5 декстрамера в буфере для окрашивания добавляли к клеткам, блокированным рецептором Fc, после инкубации в течение 30 минут при температуре 4°C. После инкубации смесь 2X антител, содержащих антимышиный CD4 Pe-Cy7 (Ozyme, ссылка BLE100422), антимышиный CD8a BV510 (Ozyme, ссылка BLE100752), антимышиный CD44 BV650 (Ozyme, ссылка BLE103049), антимышиный CD62L BV711 (Ozyme, ссылка BLE104445), антимышиный CD45 APC (Ozyme, ссылка BLE103112), антимышиный PD1 PERCP-Cy5.5 (Ozyme, ссылка BLE109119), антимышиный CD69 APC-eFluor780 (eBioscience, ссылка 47-0691-80) и краситель на жизнеспособность eFluor™ 520 (eBioscience, ссылка 65-0867-14) готовили в буфере для окрашивания. 50 мкл коктейля антител добавляли к окрашенным декстрамером клеткам после 20 минут инкубации при температуре 4°C. После стадий окрашивания клетки дважды промывали буфером для окрашивания путем центрифугирования в течение 6 мин при 1300 об/мин при температуре 4°C и ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания перед получением и анализом посредством проточной цитометрии. События регистрировались на живых CD45+CD8-клетках. На фиг. 2 показан процент CD8+ Т-клеток, положительных по окрашиванию декстрамером.

[00133] Смотрите фиг. 2, на которой показан процент CD8+ Т-клеток, положительных по окрашиванию декстрамером, на 24 день после введения первичной дозы. Группы 5 и 6 представляют собой гетерологичные прайм-буст группы, демонстрирующие синергистический эффект по сравнению с гомологичными прайм-буст группами.

[00134] Результаты анализа ELISpot демонстрируют увеличение количества клеток селезенки, производящих IFN-гамма, по сравнению с однократным введением по сравнению с двумя введениями RepGP70 или AdGP70. Неожиданно оказалось, что введение гетерологичной прайм-буст дозы (AdGP70 с последующим RepGP70 или наоборот) индуцировало более сильный периферический иммунный ответ по сравнению с введением гомологичной прайм-буст дозы с AgGP70 или RepGP70. Смотрите фиг. 1 и 2. Данные

показывают неожиданный синергизм между двумя разными типами иммуногенов в их способности стимулировать более устойчивые Т-клеточные ответы, включая в себя ответы CD8⁺ Т-клеток, при объединении в введении гетерологичной прайм-буст дозы. Результаты также показывают, что гетерологичная прайм-буст схема введения с использованием сначала RepGP70, а затем введения AdGP70 представляет собой более благоприятное условие для индукции антиген-CD8⁺ Т-клеток, как было выявлено иммуноанализом на декстрамер. Смотрите фиг. 2.

[00135] Соответственно, в настоящем документе представлен способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта с использованием гетерологичной схемы введения, причем способ предусматривает введение первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген, или иммуноген, содержащий один или больше эпитопов CD8⁺ Т-клеток; и введение второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток в антигене или иммуногене вирусного вектора, причем индуцируется антигенспецифический ответ CD8⁺ Т-клеток. Первую композицию или вторую композицию вводят в виде первичной дозы, а одну из первой или второй композиции вводят в виде бустерной дозы при условии, что вводятся как первая, так и вторая композиции.

[00136] Пример 4: Применение композиции нереплицирующегося вирусного вектора и композиции связанного с фторуглеродом пептида в гетерологичной схеме введения.

[00137] Синергизм между AdGP70 и RepGP70 исследуют путем оценки противоопухолевой активности у мышей BALB/c, зараженных опухолевыми клетками CT26. Для эксперимента использовали самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель. В день 0 мышам подкожно вводят 2×10^4 клеток CT26 в 100 мкл PBS. Вакцинную композицию AdGP70 и RepGP70 готовят в соответствии с примером 1, причем составленные вакцины готовят в виде 50 мкл растворов для инъекций. Композиции вводятся подкожно по схеме прайм/буст с 14 днями между введением первичной дозы и бустерной дозы.

[00138] Группа 1 получала 50 мкл RepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 1 и день 14, соответственно. Группа 2 получала подкожно по 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) в день 7 и день 14, соответственно. Группа 3 получала только вакцину 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) и RepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 7 и день 14, соответственно. Группа 4 получала

50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) и 50 мкл AdGP70 (2×10^9 мкг) подкожно в день 1 и день 14, соответственно. Группа 5 не получала лечения.

[00139] Обе вакцины PepGP70 и AdGP70 исследовали по отдельности или в виде прайм-буст комбинаций для стимуляции противоопухолевого ответа. Схема введения вакцины, состоящая из прайм/буст комбинации, способствует лучшему противоопухолевому ответу по сравнению с PepGP70 и AdGP70, исследованными индивидуально.

[00140] Пример 5: Применение композиции нереплицирующегося вирусного вектора и композиции связанного с фторуглеродом пептида в гетерологичной схеме введения в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек (анти-PD1)

[00141] Приготовление AdGP70 (композиция невирусного вектора) и PepGP70 (композиция связанного с фторуглеродом пептида) раскрыто в примере 1, причем AdGP70 представляет собой аденовирусный вектор с дефицитом репликации, экспрессирующий GP70 (**SEQ ID NO: 1**), а PepGP70 представляет собой комбинацию четырех пептидов (**SEQ ID NO: 68-71**), индивидуально присоединенных к фторуглеродной цепи и присутствующих в мицеллах; а приготовление композиции ингибитора иммунных контрольных точек раскрыто в примере 2.

[00142] Синергизм между AdGP70 и PepGP70 в комбинации с лечением анти-PD1 исследовали путем оценки индуцированного вакциной иммунного ответа у мышей BALB/c, зараженных опухолевыми клетками CT26. В эксперименте использовали самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (n=12 на группу). Животных анестезировали смесью кетамин-домитор (0,7/80 мг/кг), чтобы дать возможность побрить животным в месте инокуляции опухолевых клеток, а пробуждение индуцировали инъекцией антиседана (2 мг/кг). В день 0 мышам подкожно в бок инъецировали 2×10^4 клеток CT26 в 100 мкл PBS.

[00143] Вакцинную композицию AdGP70 и PepGP70 готовили согласно примеру 1, причем составленные вакцины получали в виде 50 мкл инъекционных растворов. Композиции вводили подкожно по прайм/буст схеме с 7 днями между введением первичной дозы и бустерной дозы. В этой экспериментальной модели опухоли бустерную дозу вводят через 7 дней вместо обычных 14 дней, чтобы обеспечить устойчивый иммунный ответ для выявления эффекта иммунного ответа против опухоли. Шесть инъекций композиции ингибитора иммунных контрольных точек, анти-PD1 (анти-CD279 - клон RMP1-14, InVivoPlus, Euromedex, ссылка BP0146-100 мг; GoInVivo, Ozyme, ссылка BLE114115) вводили внутрибрюшинным путем.

[00144] Группа 1 (n=12) получала 50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 7 и день 14, соответственно, и 200 мкг антимышиного PD1 в 100 мкл внутрибрюшинно в дни

7, 11, 14, 18, 22 и 25. Группа 2 (n=12) получала 50 мкл AdGP70 (2×10^9 мкг) подкожно в день 7 и день 14, соответственно, и 200 мкг антимышиного PD1 в 100 мкл внутривентрально в дни 7, 11, 14, 18, 22 и 25. Группа 3 (n=12) получала только вакцину 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) и RepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 7 и день 14, соответственно, и 200 мкг антимышиного PD1 в 100 мкл внутривентрально в дни 7, 11, 14, 18, 22 и 25. Группа 4 (n=12) получала 50 мкл RepGP70 (50 мкг/пептид) и 50 мкл AdGP70 (2×10^9 мкг) подкожно в день 7 и день 14, соответственно, и 200 мкг антимышиного PD1 в 100 мкл внутривентрально в дни 7, 11, 14, 18, 22 и 25. Группа 5 получала 200 мкг антимышиного PD1 в 100 мкл внутривентрально в дни 7, 11, 14, 18, 22 и 25. Группа 6 (n=12) не получала лечения.

[00145] Для анализа декстрамера PBMC, собранные в день 6 (D6) или день 20 (D20), окрашивали декстрамером H-2 Ld, полученным с пептидом AH1 (эпитоп CD8+ Т-клеток, полученный из GP70, последовательность: SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 73)), меченный фикоэритрином (PE). Процесс окрашивания клеток для анализа посредством проточной цитометрии описывается следующим образом. 200 мкл образцов цельной крови из групп 1–6 животных собирали с помощью техники ретроорбитального кровотока в пробирку, покрытую ЭДТА, и несколько раз перемешивали для предотвращения свертывания. Эритроциты лизировали с использованием многовидового буфера для лизиса эритроцитов в соответствии с рекомендациями производителя (eBiosciences, ссылка 00-4300-54). Индивидуальные образцы PBMC от 1 до 6 животных культивировали в 200 мкл полной культуральной среды, состоящей из RPMI Glutamax 1640 (GIBCO, ссылка 11548876) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (GIBCO, ссылка 10270-098) и 1% раствора пенициллин-стрептомицина (GIBCO, ссылка 11548876) в 96-луночных планшетах. Планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, 5% CO₂ в увлажненной среде. После завершения лизиса эритроцитов, инкубации PBMC от отдельных мышей промывали буфером для окрашивания (DPBS1X с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM ЭДТА и 1% раствора пенициллин-стрептомицина) центрифугированием в течение 6 мин при 1300 об/мин при комнатной температуре. Рецепторы Fc блокировали путем инкубации клеток селезенки в течение 10 минут при температуре 4°C с 25 мкл буфера для холодного окрашивания, содержащего антитело к CD16/32 мыши, разведенное до 1:200. Затем клетки окрашивали либо соответствующим декстрамером AH-1/H-2 Ld (Immudex, ссылка JG3294-OPT), либо нерелевантным декстрамером NP118-126/H-2 Ld (Immudex, ссылка JG2750-OPT). 25 мкл соответствующего предварительно разведенного 1:2,5 декстрамера в буфере для окрашивания добавляли к клеткам, заблокированным рецептором Fc, после инкубации в течение 30 минут при температуре 4°C. После инкубации коктейль 2X антител, содержащий антимышиный CD4 Pe-Cy7 (Ozyme, ссылка BLE100422),

антимышиный CD8a BV510 (Ozyme, ссылка BLE100752), антимышиный CD44 VioBlue (Miltenyi, ссылка 130-102-443), антимышиный PD1 PERCP-Cy5.5 (Ozyme, ссылка BLE109119), CD25 PEeFluor 610 (eBioscience, ссылка 61-0251-82), CD11b Alexa 700 (eBioscience, ссылка 56-0112-82) и краситель на жизнеспособность eFluor™ 520 (eBioscience, ссылка 65-0867-14) получали в буфере для окрашивания. 50 мкл коктейля антител добавляли к окрашенным декстрамером клеткам после инкубации в течение 20 минут при температуре 4°C. После стадий окрашивания клетки дважды промывали буфером для окрашивания путем центрифугирования в течение 6 мин при 1300 об/мин при температуре 4°C. Окрашенные на поверхности клетки ресуспендировали в 200 мкл рабочего раствора фиксации/пермеабиллизации, приготовленного в соответствии с рекомендациями производителя (набор буферов для фиксации/пермеабиллизации и пермеабиллизации, eBioscience, ссылка 00-5523-00), и инкубировали 25 минут при температуре 4°C. Затем клетки промывали 1-кратным буфером для пермеабиллизации путем центрифугирования в течение 6 минут при 1300 об/мин при температуре 4°C перед окрашиванием антимышиным перфорином APC (eBioscience, ссылка 17-9392-80). 50 мкл предварительно разведенного Perforin APC добавляли к клеткам, окрашенным декстрамером, после инкубации в течение 20 минут при температуре 4°C. Клетки дважды промывали 1-кратным буфером для пермеабиллизации путем центрифугирования в течение 6 мин при 1300 об/мин при температуре 4°C, затем ресуспендировали в буфере для окрашивания перед получением и анализом посредством проточной цитометрии. События регистрировали на живых клетках декстрамер+ CD8+. На фиг. 3 показан процент CD8+ Т-клеток, положительных по окрашиванию декстрамером, выраженный как среднее значение для каждой группы в день 6 (D6) и день 20 (D20).

[00146] Обе вакцинные композиции RepGP70 и AdGP70, испытанные индивидуально или в виде прайм-буст комбинаций, синергизируют с лечением анти-PD1 в своей способности стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, как показано на фиг. 3, причем антигенспецифические CD8+ Т-клетки измеряли в день 6 (D6) и день 20 (D20). Комбинация вакцины, состоящая из прайма с RepGP70 и бустера с AdGP70 с обработкой анти-PD1, способствует гораздо более высокому ответу по сравнению с другими схемами вакцинации. Все схемы введения вакцины (группы с 1 по 4) синергичны с анти-PD1, но схема введения с RepGP70 в качестве первичной дозы и AdGP70 в качестве бустерной дозы (группа 4) продемонстрировала синергизм по сравнению с вакцинами с гомологичной схемой введения (группы 1 и 2).

[00147] Пример 6: Применение композиции связанного с фторуглеродом пептида в гомологичной схеме введения для индукции антигенспецифического ответа CD4+ и CD8+ Т-клеток и противоопухолевой активности

[00148] Композицию связанного с фторуглеродом пептида (FP-OVA) готовили в соответствии с раскрытием в примере 1, за исключением того, что использовали пептид OVA вместо пептидов GP70. FP-OVA состоит из пептида, полученного из овальбумина (последовательность ISQAVHAAHAEINEAGRESIINFTEWT (**SEQ ID NO: 75**)), содержащего эпитоп CD4+ Т-клеток (Ova 323-339, последовательность ISQAVHAAHAEINEAGR (**SEQ ID NO: 76**)) и эпитоп CD8+ Т-клеток (положение аминокислот 257-264, последовательность SIINFTEKL (**SEQ ID NO: 77**)).

[00149] В этом эксперименте самок мышей C57BL/6 (n=15/группа) вакцинировали подкожно в день 0 и день 14 посредством 200 мкг вакцины FP-OVA в 100 мкл (группа 1) или 100 мкл раствора вспомогательного вещества (группа 2). На 24 день по 5 мышей в каждой группе умерщвляли для измерения иммунного ответа посредством анализа ELISpot. Иммунный ответ на композицию вакцины измеряли следующим образом: селезенки собирали и клетки стимулировали 1 нг/мл эпитопа OVA-CTL (Ova 257-264, последовательность SIINFTEKL (**SEQ ID NO: 77**) (эпитоп CD8+ Т-клеток)) или 10 мкг/мл OVA-HTL (Ova 323-339, последовательность ISQAVHAAHAEINEAGR (**SEQ ID NO: 76**) (эпитопы CD4+ Т-клеток)) в анализе IFN γ ELISpot. Подсчитывали количество клеток, образующих пятно IFN γ (SFC). На фиг. 4А показано количество клеток, образующих пятно IFN γ (SFC)/10⁶ спленоцитов, производимых в ответ на OVA-CTL или OVA-HTL, для отдельных мышей после вычитания значений контрольной лунки (линия представляет собой среднее значение ответа). Данные определяли как параметрические с использованием критерия нормальности Колмогорова-Смирнова, а статистический анализ проводили с использованием критерия t Стьюдента, где P < 0,001 = ***.

[00150] На 24 день 10 оставшихся мышей в каждой группе получали подкожную инъекцию 2×10⁶ клеток E.G7-OVA; клетки тимомы EL4 мыши стабильно трансфицированы комплементарной ДНК куриного овальбумина (OVA) и, таким образом, экспрессируют эпитопы OVA в качестве уникального антигена. Зараженных мышей отбирали, когда размер опухоли достигал 150 мм². На фиг. 4В показана общая выживаемость, измеренная во времени в двух разных группах. На фиг. 5 показан рост опухоли, измеренный с течением времени в группе вспомогательного вещества (фиг. 5А) и группе вакцины (фиг. 5В). На фиг. 4 и 5 показана эффективность связанных с фторуглеродом пептидов, причем пептиды являются уникальными раковыми антигенами, в качестве профилактического средства против рака.

[00151] Во втором эксперименте самки мышей C57BL/6 (n=10/группа) получали подкожную инъекцию 2×10^6 клеток E.G7-OVA в один бок в день 0 и второе введение 2×10^6 клеток E.G7-OVA у выжившего животного в противоположный бок на 50 день. Затем группа 1 получала 200 мкг вакцины FP-OVA в 100 мкл подкожно в день 1 и день 8. Группа 2 получала 200 мкг вакцины FP-OVA в 100 мкл подкожно в день 3 (соответствует дню обнаружения пальпируемой опухоли по меньшей мере у одного животного) и день 10. Группа 3 получала 100 мкл вспомогательного вещества подкожно в день 1 и день 8. Зараженных мышей отбирали, когда размер опухоли достигал 150 мм². На фиг. 6 показана общая выживаемость, измеренная с течением времени в различных группах, причем каждая из групп 1 и 2 характеризовалась коэффициентом выживаемости не менее чем 60%, демонстрируя эффективность связанных с фторуглеродом пептидов, причем пептиды являются уникальными раковыми антигенами, в качестве терапевтического средства для рака.

[00152] Пример 7: Применение композиции нереплицирующегося вирусного вектора или композиции связанного с фторуглеродом пептида в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек (анти-PD1)

[00153] Получение AdGP70 (композиция невирусного вектора) и PerGP70 (композиция связанного с фторуглеродом пептида) раскрыто в примере 1, причем AdGP70 представляет собой аденовирусный вектор с дефицитом репликации, экспрессирующий GP70 (SEQ ID NO: 1), а PerGP70 представляет собой комбинацию четырех пептидов (SEQ ID NO: 68-71), индивидуально присоединенных к фторуглеродной цепи и присутствующих в мицеллах; и приготовление композиции ингибитора иммунных контрольных точек раскрыто в примере 2.

[00154] Синергизм между AdGP70 или PerGP70 с лечением анти-PD1 исследовали путем оценки их соответствующей противоопухолевой активности против опухоли карциномы толстой кишки CT26 у мышей BALB/c. В эксперименте использовали самок мышей BALB/c возрастом 6-8 недель (n=12 на группу). Животных анестезировали смесью кетамин-домитор (0,7/80 мг/кг), чтобы дать возможность побрить животных в месте инокуляции опухолевых клеток, а пробуждение индуцировали инъекцией антиседана (2 мг/кг). В день 0 в бок мышей вводили 2×10^4 клеток CT26 в 100 мкл PBS. Пальпацию опухоли проводили пять раз в неделю для определения даты первого положительного обнаружения опухоли. После обнаружения солидной опухоли ее размер измеряли приблизительно три раза в неделю. Измерения размера опухоли проводили штангенциркулем по двум измерениям и объему, определяемому по формуле: $L \cdot l^2 / 2$; (L = более длинная ось и l = более короткая ось). Животных умерщвляли в соответствии со

следующими гуманными конечными точками: объем опухоли ≥ 2000 мм³, наличие некротической или изъязвленной опухоли, нарушение подвижности, включая в себя временную протрацию или сгорбленную позу, нарушение жизненно важной физиологической функции, включая в себя дыхание, значительное вздутие живота или $>20\%$ потери массы за неделю.

[00155] Составленные вакцинные композиции готовили в соответствии с примерами 1 и 2 в виде 50 мкл инъекционных растворов и вводили подкожно в соответствии с прайм/буст графиком с 14 днями между введением первичной дозы и бустерной дозы. Шесть инъекций иммуно-контрольной точки, анти-PD1 (анти-CD279 - клон RMP1-14, InVivoPlus, Euromedex, ссылка BP0146-100 мг; GoInVivo, Ozyme, ссылка BLE114115) вводили внутрибрюшинным путем каждые 3 или 4 дня после инициирования опухоли.

[00156] Группа 1 (n=15) получала только препараты композиции вакцин, 50 мкл RepGP70 (50 мкг/пептид) в день 1 и день 15, соответственно. Группа 2 (n=14) получала 50 мкл RepGP70 (50 мкг/пептид) в день 1 и день 15, соответственно и 200 мкг антимышиного PD1 в дозе доставки 100 мкл (анти-CD279 - клон RMP1-14) в дни 4, 7, 11, 15, 18 и 22. Группа 3 (n=14) получала только вакцинные препараты, 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) в день 0 и день 14, соответственно. Группа 4 (n=15) получала 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) в день 0 и день 14, соответственно, и 200 мкг антимышиного PD1 в дозе доставки 100 мкл (анти-CD279 - клон RMP1-14) в дни 4, 7, 11, 15, 18 и 22. Группа 5 (n=15) получала 50 мкл вакцинного препарата, содержащего только агонист TLR9, в день 1 и день 15, соответственно, и 200 мкг антимышиного PD1 в дозе доставки 100 мкл (анти-CD279 - клон RMP1-14) в дни 4, 7, 11, 15, 18 и 22. Группа 6 (n=12) не получала лечения. Результаты представлены на фиг. 7 (объем опухоли у отдельного животного) и фиг. 8А и 8В (общая выживаемость для каждой группы).

[00157] Обе композиции RepGP70 и AgGP70 способствуют противоопухолевой активности с задержкой роста опухоли и улучшают общую выживаемость, как показано на фиг. 7 и фиг. 8А и 8В, соответственно. Кроме того, обе композиции вакцин получают преимущество от комбинированного лечения анти-PD1, демонстрируя более высокую общую выживаемость и профиль замедленного роста опухоли по сравнению с животными, которые получали только композиции вакцины или лечение анти-PD1.

[00158] Пример 8: Применение композиции нереплицирующегося вирусного вектора или композиции связанного с фторуглеродом пептида в комбинации с композицией ингибитора миелоидных супрессорных клеток (MDSC)

[00159] AdGP70 или RepGP70 в комбинации с ингибитором MDSC исследуют путем оценки противоопухолевой активности у мышей BALB/c, зараженных опухолевыми

клетками СТ26. Для эксперимента использовали самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель. В день 0 мышам подкожно вводят 2×10^4 клеток СТ26 в 100 мкл PBS. Вакцинную композицию AdGP70 и PepGP70 готовят в соответствии с примером 1, причем составленные вакцины готовят в виде 50 мкл растворов для инъекций. Композиции вводят подкожно по схеме прайм/буст с 14 днями между введением первичной дозы и бустерной дозы с отдельными животными, получающими либо дозу AdGP70, либо дозу PepGP70.

[00160] Группе 1 вводят 50 мкл PepGP70 (50 мкг/пептид) подкожно в день 1 и день 14, а ингибитор MDSC вводят ежедневно внутрибрюшинно. Группе 2 вводят 50 мкл AdGP70 (2×10^9 ifu) подкожно в день 1 и день 14. Группе 3 вводят ингибитор MDSC ежедневно внутрибрюшинно. Группа 4 не получает лечения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация вакцин, содержащая от двух до трех композиций, выбранных из:

а) первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток;

б) второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена; а также

с) третьей композиции, содержащей иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора,

причем когда выбраны первая композиция и вторая композиция, либо первая, либо вторая композиция является первичной композицией или бустерной композицией.

2. Комбинация вакцин по п. 1, в которой антииммуносупрессор нацелен на PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD 137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3, GAL1, GAL3, GAL9, ADORA, CD276, VTCN1, IDO1, KIR3DL1, HAVCR2, VISTA, CD244, ADAM17, COX2, PGE-2, iNOS2, PDE5, c-kit, ARG1, PI3K, CSF-1R, каспазу-8, CCL2, RON, ROS или S100A8/A9.

3. Комбинация вакцин по п. 2, в которой антииммуносупрессор нацелен на PD1 или PDL1.

4. Комбинация вакцин по п. 2, в которой антииммуносупрессор представляет собой антитело к PD1 или PDL1.

5. Комбинация вакцин по п. 1, в которой иммуноактиватор нацелен на Toll-подобный рецептор (TLR) 3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, NOD1, NOD2, STING, cGAS, IFR3, рецептор IL-2, рецептор IL12 или рецептор IFN-альфа.

6. Комбинация вакцин по п. 1, в которой нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, вектор альфавируса, вектор герпесвируса, вектор вируса кори, вектор поксвируса или вектор вируса везикулярного стоматита.

7. Комбинация вакцин по п. 6, в которой нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и E3.

8. Комбинация вакцин по п. 1, в которой первая, вторая или третья композиция составлена для парентерального, перорального, глазного, ректального, назального, трансдермального, местного или вагинального введения.

9. Комбинация вакцин по п. 1, в которой антиген или иммуноген происходит от патогена.

10. Комбинация вакцин по п. 9, в которой патоген представляет собой вирус, гриб, паразита или бактерию.

11. Комбинация вакцин по п. 10, в которой вирус представляет собой EBV, HPV, HTLV-1, MCPvV, KSHV, HERV, HCV или HBV.

12. Комбинация вакцин по п. 1, в которой антиген или иммуноген представляет собой раковый антиген.

13. Комбинация вакцин по п. 1, в которой первая композиция представляет собой первичную композицию, а вторая композиция представляет собой бустерную композицию.

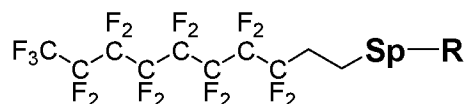
14. Комбинация вакцин по п. 1, в которой вторая композиция представляет собой первичную композицию, а первая композиция представляет собой бустерную композицию.

15. Комбинация вакцин по п. 1, в которой фторуглеродная часть связанного с фторуглеродом пептида представляет собой фторуглеродную цепь из 3-30 атомов углерода.

16. Комбинация вакцин по п. 15, в которой один или более фторсодержащих фрагментов фторуглеродной цепи замещены хлором, бромом, йодом, водородом или метильной группой.

17. Комбинация вакцин по п.1, в которой связанный с фторуглеродом пептид характеризуется структурой $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$, где $m =$ от 3 до 30, $n \leq 2m+1$, $y =$ от 0 до 15, $x \leq 2y$, $(m+y) = 3-30$, Sp представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а R представляет собой пептид.

18. Комбинация вакцин по п. 1, в которой связанный с фторуглеродом пептид характеризуется структурой



где Sp представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а R представляет собой пептид.

19. Комбинация вакцин по п. 1, в которой связанный с фторуглеродом пептид второй композиции содержит по меньшей мере один связывающий МНС класса II эпитоп и по меньшей мере один связывающий МНС класса I эпитоп.

20. Комбинация вакцин по п. 1, в которой каждая из первой, второй или третьей композиций независимо дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, разбавителей или адъювантов.

21. Комбинация вакцин по п. 20, в которой адъювант представляет собой агонист TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 или TLR9, STING, cGAS, IFR3, NOD1 или NOD2.

22. Комбинация вакцин по п. 1, в которой первая, вторая или третья композиция находится в форме жидкости, эмульсии, твердого вещества, аэрозоля или газа.

23. Комбинация вакцин по п. 1, в которой выбраны первая композиция и вторая композиция.

24. Комбинация вакцин по п. 1, в которой выбрана одна из первой композиции или второй композиции, и выбрана третья композиция.

25. Способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий:

а) введение первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, содержащий один или более эпитопов CD8+ Т-клеток; а также,

б) введение второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется: i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков; ii) происхождением от антигена или иммуногена первой композиции и iii) содержанием одного или более эпитопов CD8+ Т-клеток первой композиции из антигена или иммуногена,

причем одна из первой композиции или второй композиции вводится в виде первичной дозы, а одна из первой композиции или второй композиции вводится в виде бустерной дозы при условии, что вводятся как первая, так и вторая композиции,

посредством чего индуцируется антигенспецифический ответ CD8+ Т-клеток.

26. Способ по п. 25, при котором первичную дозу и бустерную дозу вводят с интервалом по меньшей мере 14 дней.

27. Способ по п. 25, при котором вторая композиция представляет собой первичную дозу, а первая композиция представляет собой бустерную дозу.

28. Способ по п. 25, при котором первая композиция представляет собой первичную дозу, а вторая композиция представляет собой бустерную дозу.

29. Способ по п. 25, при котором субъект представляет собой млекопитающее, птицу, рептилию, амфибию или рыбу.

30. Способ по п. 2, при котором субъект представляет собой человека, корову, собаку, кошку, козу, овцу, свинью, лошадь, индейку, утку или курицу.

31. Способ по п. 25, дополнительно предусматривающий введение третьей композиции, содержащей иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора.

32. Способ по п. 31, при котором антииммуносупрессор нацелен на PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD 137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3, GAL1,

GAL3, GAL9, ADORA, CD276, VTCN1, IDO1, KIR3DL1, HAVCR2, VISTA, CD244, ADAM17, COX2, PGE-2, iNOS2, PDE5, c-kit, ARG1, PI3K, CSF-1R, каспазу-8, CCL2, RON, ROS или S100A8/A9.

33. Способ по п. 31, при котором антииммуносупрессор нацелен на PD1 или PDL1.

34. Способ по п. 31, при котором антииммуносупрессор представляет собой антитело к PD1 или PDL1.

35. Способ по п. 31, при котором иммуноактиватор нацелен на Toll-подобный рецептор (TLR) 3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, NOD1, NOD2, STING, cGAS, IFR3, рецептор IL-2, рецептор IL12 или рецептор IFN-альфа.

36. Способ по п. 31, при котором стадию введения третьей композиции выполняют после введения первой композиции.

37. Способ по п. 25, при котором антиген или иммуноген происходит от патогена.

38. Способ по п. 37, при котором патоген представляет собой вирус, гриб, паразита или бактерию.

39. Способ по п. 38, при котором вирус представляет собой EBV, HPV, HTLV-1, MCPvV, KSHV, HERV, HCV или HBV.

40. Способ по п. 25, при котором антиген или иммуноген представляет собой раковый антиген.

41. Способ по п. 25, при котором индуцированный иммунный ответ представляет собой терапевтическое или профилактическое лечение пациентов с немелкоклеточным раком легких, раком молочной железы, раком печени, раком головного мозга, раком желудка, раком поджелудочной железы, раком почки, раком яичников, миеломой, острым миелогенным лейкозом, хроническим миелогенным лейкозом, раком головы и шеи, колоректальным раком, раком почек, раком пищевода, меланомой кожи и/или раком предстательной железы.

42. Способ по п. 25, при котором индуцированный иммунный ответ представляет собой терапевтическое или профилактическое лечение субъектов с хронической инфекцией или риском воздействия патогенов, вызывающих хронические инфекции, при этом патогены выбраны из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса гепатита В, вируса гепатита D, вируса герпеса, вируса Эпштейна-Барра, цитомегаловируса, вируса папилломы человека или Т-лимфотропного вируса человека типа III.

43. Способ по п. 26, при котором путь введения первой и/или второй композиции выбирают из парентерального, подкожного, перорального, эпидермального, внутрикожного, внутримышечного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутривенного, назального, интратрахеального, кишечного, сублингвального, ректального или вагинального.

44. Способ по п. 25, при котором нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, вектор альфавируса, вектор герпесвируса, вектор вируса кори, вектор поксвируса или вектор вируса везикулярного стоматита.

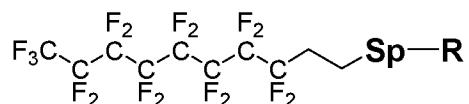
45. Способ по п. 44, при котором нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и/или E3.

46. Способ по п. 25, при котором фторуглеродная часть связанного с фторуглеродом пептида представляет собой фторуглеродную цепь от 3 до 30 атомов углерода.

47. Способ по п. 46, при котором один или более фторсодержащих фрагментов фторуглеродной цепи замещены хлором, бромом, йодом, водородом или метильной группой.

48. Способ по п. 25, при котором связанный с фторуглеродом пептид характеризуется структурой $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$, где $m =$ от 3 до 30, $n \leq 2m+1$, $y =$ от 0 до 15, $x \leq 2y$, $(m+y)=3-30$, Sp представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а R представляет собой пептид.

49. Способ по п. 25, при котором связанный с фторуглеродом пептид характеризуется структурой



где **Sp** представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а **R** представляет собой пептид.

50. Способ по п. 25, при котором фторуглеродный пептид второй композиции содержит по меньшей мере один связывающий МНС класса II эпитоп и по меньшей мере один связывающий МНС класса I эпитоп.

51. Способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий:

а) введение первой композиции, содержащей нереплицирующийся вирусный вектор, кодирующий антиген или иммуноген, или его фрагмент, содержащий один или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; или

б) введение второй композиции, содержащей мицеллы, содержащие связанные с фторуглеродом пептиды, причем каждый пептид, связанный с фторуглеродом, характеризуется:

i) длиной от 15 до 75 аминокислотных остатков;

ii) происхождением от антигена или иммуногена; а также,

iii) содержанием одного или более эпитопов CD8⁺ Т-клеток; а также,

с) введение отдельно третьей композиции, содержащей иммуномодулятор, выбранный из антииммуносупрессора или иммуноактиватора,

посредством чего индуцируется антигенспецифический ответ CD8⁺ Т-клеток.

52. Способ по п. 51, при котором субъект представляет собой млекопитающее, птицу, рептилию, земноводное или рыбу.

53. Способ по п. 51, при котором субъект представляет собой человека, корову, собаку, кошку, козу, овцу, свинью, лошадь, индейку, утку или курицу.

54. Способ по п. 51, при котором антииммуносупрессор нацелен на PD1, PDL1, PDL2, CD28, CD80, CD86, CTLA4, B7RP1, ICOS, B7RPI, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, KIR, TCR, LAG3, CD 137, CD137L, OX40, OX40L, CD27, CD70, CD40, CD40L, TIM3, GAL1, GAL3, GAL9, ADORA, CD276, VTCN1, IDO1, KIR3DL1, HAVCR2, VISTA, CD244,

ADAM17, COX2, PGE-2, iNOS2, PDE5, c-kit, ARG1, PI3K, CSF-1R, каспазу-8, CCL2, RON, ROS или S100A8/A9.

55. Способ по п. 51, при котором антииммуносупрессор нацелен на PD1 или PDL1.

56. Способ по п. 51, при котором антииммуносупрессор представляет собой антитело к PD1 или PDL1.

57. Способ по п. 51, при котором иммуноактиватор нацелен на Toll-подобный рецептор (TLR) 3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, NOD1, NOD2, STING, cGAS, IFR3, рецептор IL-2, рецептор IL12 или рецептор IFN-альфа.

58. Способ по п. 51, при котором стадию введения третьей композиции проводят после введения первой или второй композиции.

59. Способ по п. 51, при котором антиген или иммуноген происходит от патогена.

60. Способ по п. 59, при котором патоген представляет собой вирус, гриб, паразита или бактерию.

61. Способ по п. 60, при котором вирус представляет собой EBV, HPV, HTLV-1, MCPvV, KSHV, HERV, HCV или HBV.

62. Способ по п. 51, при котором антиген или иммуноген представляет собой раковый антиген.

63. Способ по п. 51, при котором индуцированный иммунный ответ представляет собой терапевтическое или профилактическое лечение пациентов с немелкоклеточным раком легких, раком молочной железы, раком печени, раком головного мозга, раком желудка, раком поджелудочной железы, раком почки, раком яичников, миеломой, острым миелогенным лейкозом, хроническим миелогенным лейкозом, раком головы и шеи, колоректальным раком, раком почек, раком пищевода, меланомой кожи и/или раком предстательной железы.

64. Способ по п. 51, при котором индуцированный иммунный ответ представляет собой терапевтическое или профилактическое лечение субъектов с хронической инфекцией или риском воздействия патогенов, вызывающих хронические инфекции, при этом патогены выбраны из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса гепатита В, вируса гепатита D, вируса герпеса, вируса Эпштейна-Барра, цитомегаловируса, вируса папилломы человека или Т-лимфотропного вируса человека типа III.

65. Способ по п. 51, при котором путь введения первой или второй композиции и третьей композиции независимо выбирают из парентерального, подкожного, перорального, эпидермального, внутрикожного, внутримышечного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутривенного, назального, интратрахеального, кишечного, сублингвального, ректального или вагинального.

66. Способ по п. 51, при котором нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой вектор аденовируса, вектор альфавируса, вектор герпесвируса, вектор вируса кори, вектор поксвируса или вектор вируса везикулярного стоматита.

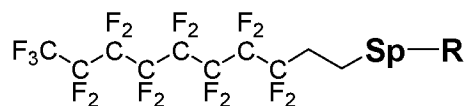
67. Способ по п. 66, при котором нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор с делецией E1 и/или E3.

68. Способ по п. 51, при котором фторуглеродная часть связанного с фторуглеродом пептида представляет собой фторуглеродную цепь из 3-30 атомов углерода.

69. Способ по п. 68, при котором один или более фторсодержащих фрагментов фторуглеродной цепи замещены хлором, бромом, йодом, водородом или метильной группой.

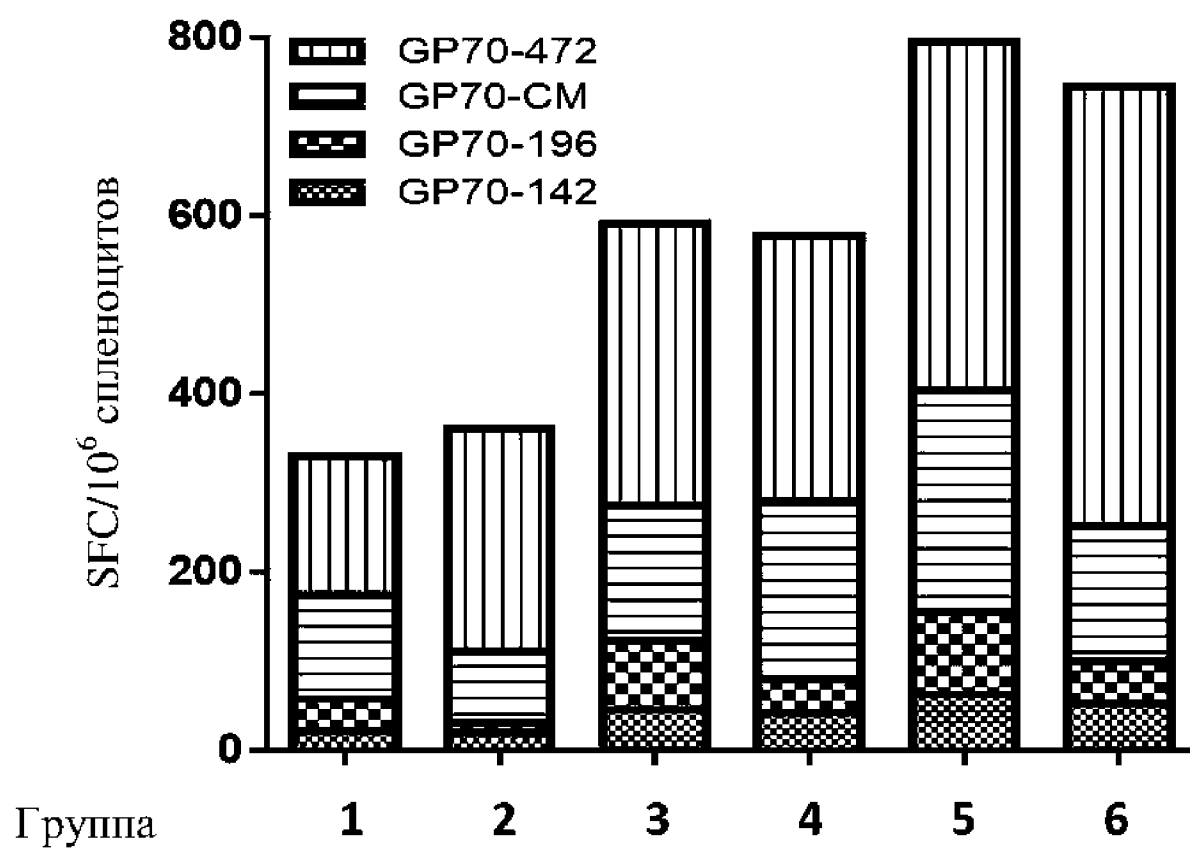
70. Способ по п. 51, при котором связанный с фторуглеродом пептид характеризуется структурой $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$, где m = от 3 до 30, $n \leq 2m+1$, y = от 0 до 15, $x \leq 2y$, $(m+y)=3-30$, Sp представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а R представляет собой пептид.

71. Способ по п. 51, при котором связанный с фторуглеродом пептид характеризуется структурой

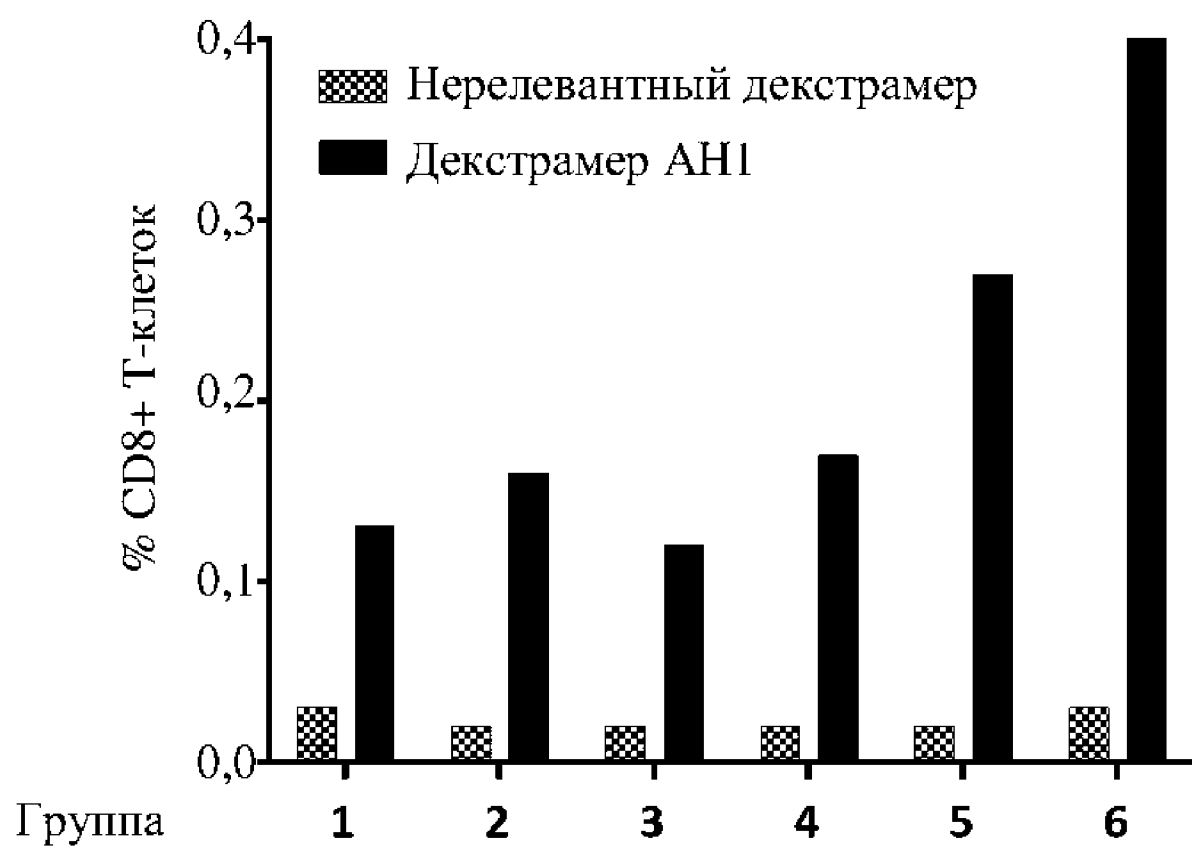


где **Sp** представляет собой необязательный химический спейсерный фрагмент, а **R** представляет собой пептид.

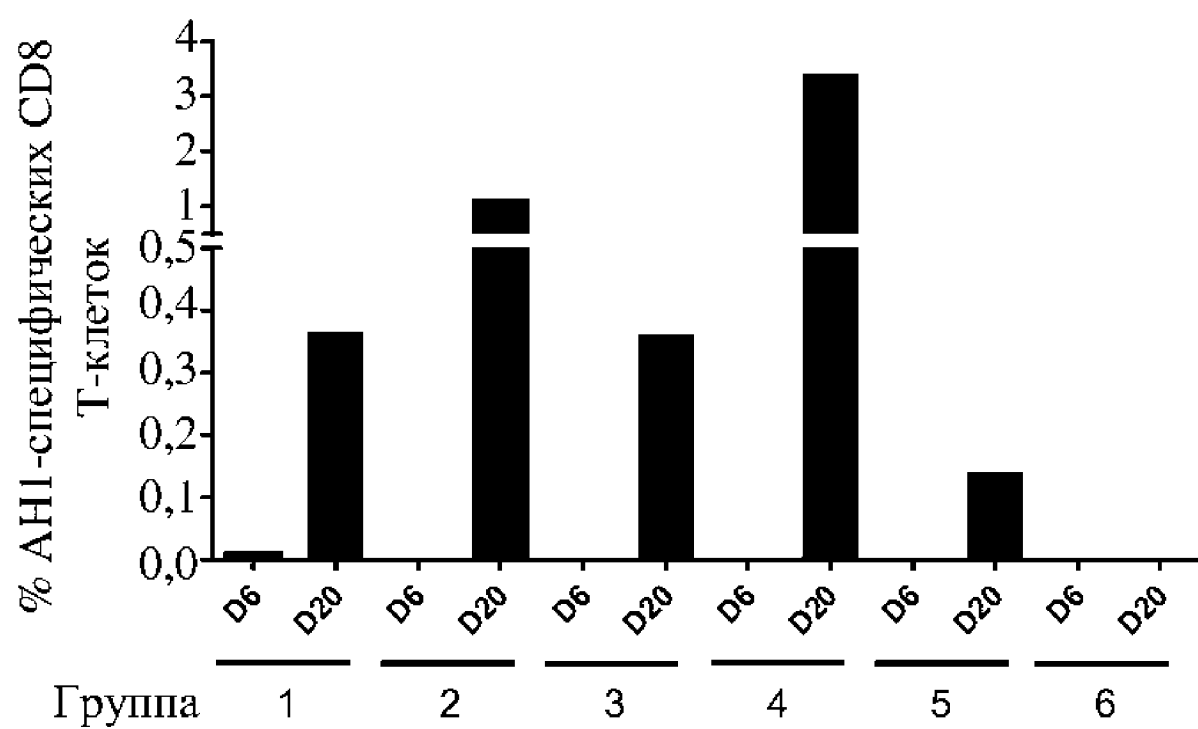
72. Способ по п. 51, при котором связанный с фторуглеродом пептид второй композиции содержит по меньшей мере один связывающий МНС класса II эпитоп и по меньшей мере один связывающий МНС класса I эпитоп.



Фиг. 1

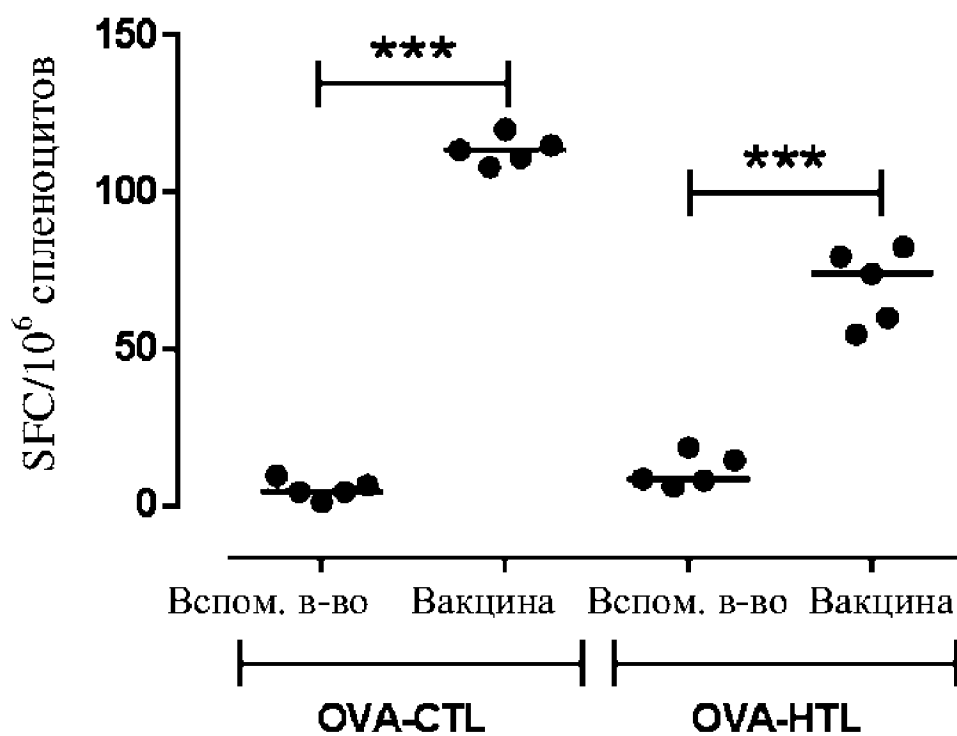


Фиг. 2



Фиг. 3

(А) Иммуногенность



Фиг. 4А

(В) Общая выживаемость



Фиг. 4В

(А) Вспомогательное вещество

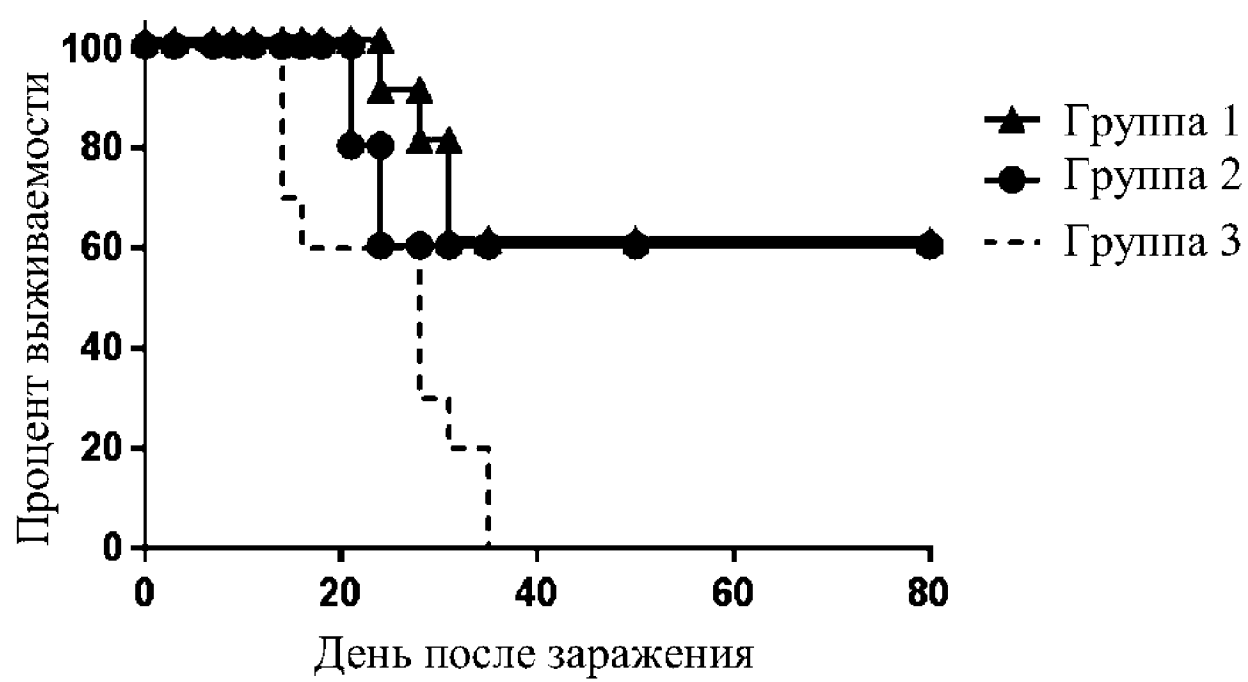


Фиг. 5А

(В) Вакцина

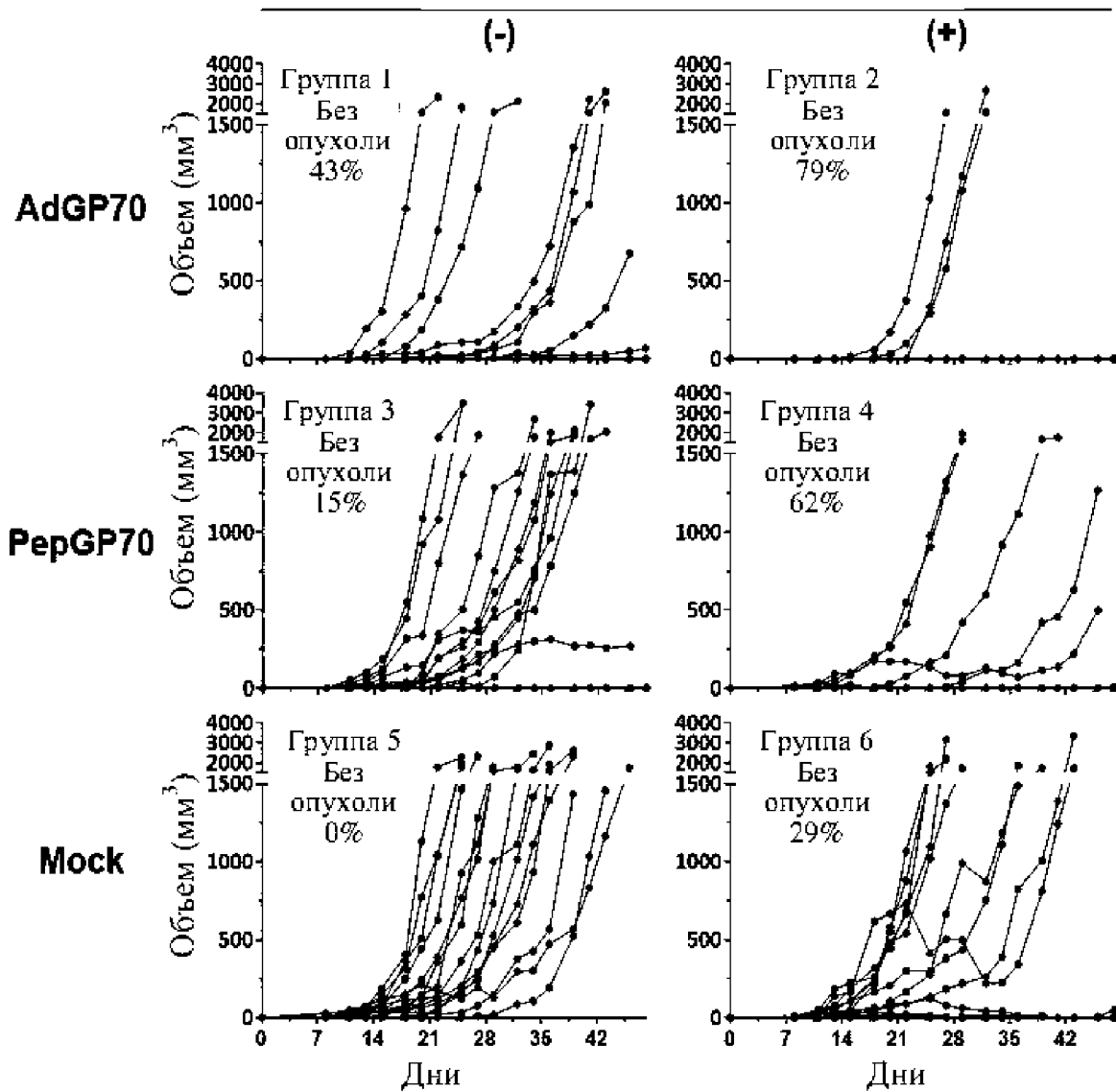


Фиг. 5В



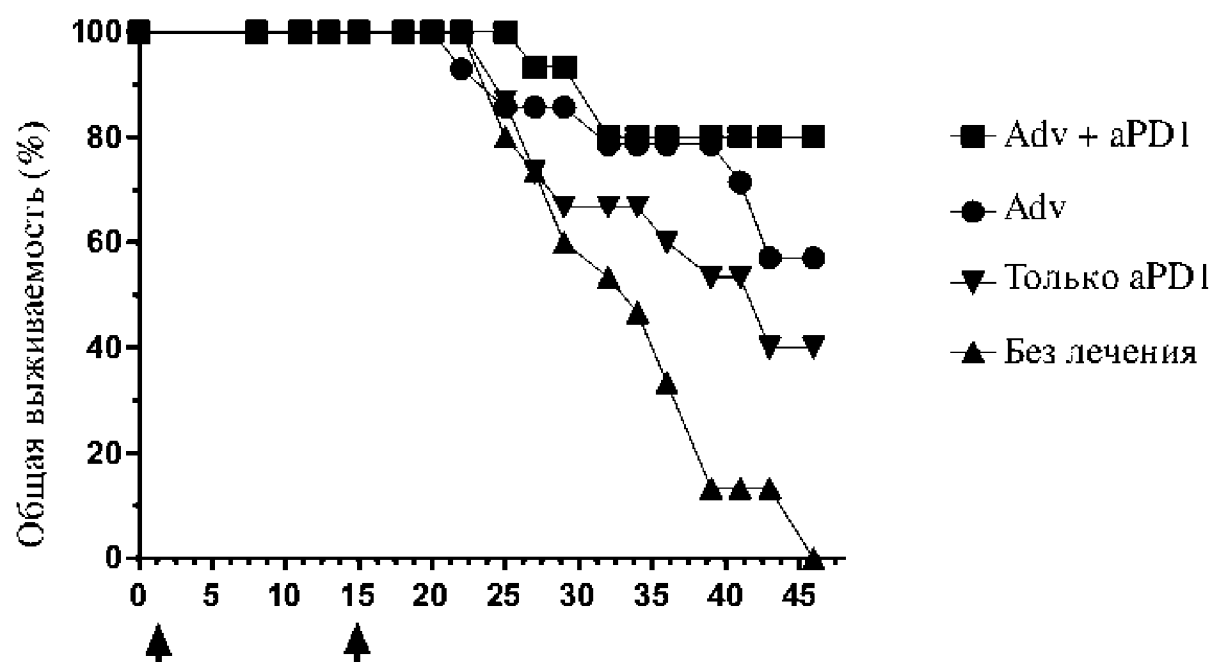
Фиг. 6

Анти-PD1



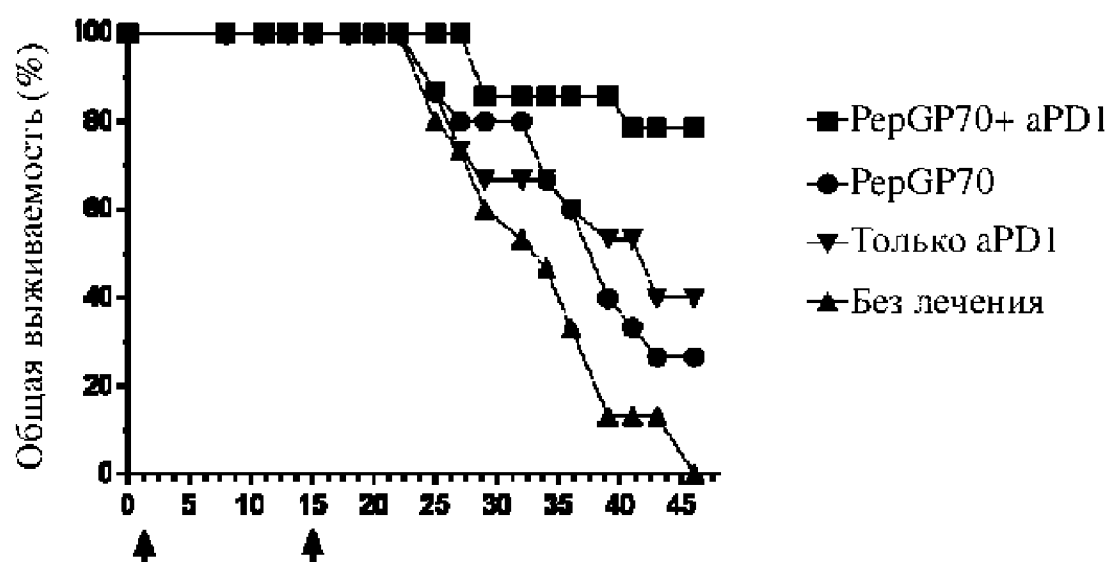
Фиг. 7

AdGP70



Фиг. 8А

PerGP70



Фиг. 8В