



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.09

(21) Номер заявки
201990071

(22) Дата подачи заявки
2017.06.19

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ

(31) 16175215.9

(32) 2016.06.20

(33) EP

(43) 2019.06.28

(86) PCT/EP2017/064882

(87) WO 2017/220463 2017.12.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АйЭсЭй ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ Б.В.
(NL)

(72) Изобретатель:
Мюлдер Гвенн Эвелин (NL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) Anonymous: "Peptides and Immunology A Guide to Handling and Storing Peptides", Mimotopes User Note 8 March 2006 (2006-03-08), pages 1-3, XP055331043, Retrieved from the Internet: URL: http://www.mimotopes.com/files/editor_upload/File/PeptidesAndAntibodies/PU3004-1Handling-and-Storing-Peptides.PDF [retrieved on 2016-12-21] the whole document, page 1, column 2, paragraph 3, page 1, column 1, paragraph 3

Anonymous: "Peptide Solubility Guidelines", ANASPEC, 28 December 2011 (2011-12-28), pages 1-2, XP002765481, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.anaspec.com/content/pd>

fs/PeptidesolubilityguidelinesFinal.pdf [retrieved on 2016-12-20] the whole document

BELL LEONARD N: "Peptide stability in solids and solutions", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 13, no. 4, 1997, pages 342-346, XP002765482, ISSN: 8756-7938, the whole document

B NUIJEN ET AL.: "Compatibility and stability of apolidine, a novel marine-derived depsipeptide antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration", ANTI-CANCER DRUGS, vol. 10, no. 10, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 879-888, XP055330691, US; NL, ISSN: 0959-4973, DOI: 10.1097/00001813-199911000-00003, page 879, column 1, paragraph 1

LUWEI ZHAO ET AL.: "Stabilization of eptifibatide by cosolvents", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 218, no. 1-2, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 43-56, XP055119808, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00618-4, abstract

STRICKLEY R G: "SOLUBILIZING EXCIPIENTS IN ORAL AND INJECTABLE FORMULATIONS", PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 21, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 201-230, XP009035738, SPRINGER NEW YORK LLC, US, ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1023/B:PHAM.0000016235.32639.23, page 214, column 1, paragraph 3 - page 222

WO-A1-2010132867

(57) Изобретение относится к новой восстанавливающей композиции, к фармацевтической композиции и набору из частей, включающему указанную восстанавливающую композицию. Изобретение также относится к способу лечения с использованием указанной фармацевтической композиции и/или к фармацевтической композиции для применения в качестве лекарственного средства. Также изобретение относится к способу восстановления высушенных пептидов и способу получения фармацевтической композиции с использованием восстанавливающей композиции по изобретению.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины и иммунологии. В частности, оно относится к новой композиции для восстановления пептидов для вакцинации. Эта композиция является особенно подходящей для получения фармацевтических вакцин на основе пептидов, которые также включают масляный адъювант.

Предпосылки к созданию изобретения

Клинические результаты показали, что наступила эра успешной терапевтической вакцинации. Регрессия поражений была показана для предраковых повреждений, вызываемых HPV, и была установлена клиническая польза, такая как пролонгированное выживание. Вакцины на основе синтетических длинных пептидов находятся в числе оптимальных вакцинных платформ. Пептидная вакцина или вакцины на основе пептидов разработаны для лечения персистентных инфекций и рака, предпочтительно нацеливая иммунную систему на устранение клеток, которые экспрессируют вирусные антигены, раковые антигены и/или неоантигены. В данной области известно, что вакцины на основе пептидов, способные вызывать эффективный клеточный иммунный ответ ($CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточный ответ), нацеленные на антиген-специфические цитотоксические Т-клетки, способны устранять антиген-экспрессирующие клетки. К числу выбранных антигенов относятся мутантные последовательности, выбранные раково-тестикулярных антигенов и вирусных антигенов (см. обзор Melief et al., 2016 Journal of Clinical Investigation, Vol 125 (9) page 3401-3412).

Одной из проблем, связанных с пептидными вакцинами, является получение физически и химически стабильных растворов для инъекций. Это, в частности, является проблемой для пептидных вакцинных эмульсий, включающих более одного пептида и адъюванты на масляной основе. Инъекционные вакцинные растворы обычно получают на месте примерно за 1-3 ч до введения пациенту, используя в качестве исходного материала высушенные, в основном лиофилизированные пептиды. Следовательно, существует необходимость в подходящей композиции для восстановления, которая позволяет быстро восстанавливать высушенные пептиды, которые затем легко можно смешать с масляными адъювантами, с получением эмульсии, которая является физически и химически стабильной в течение по меньшей мере от 2 до 3 ч хранения при комнатной температуре перед введением пациенту.

Подробное описание изобретения

Композиции для восстановления

Изобретение относится к новой композиции для восстановления пептидов для вакцинации. Эта композиция для восстановления включает или состоит из приблизительно 60-80% об./об. водного раствора, включающего органическую кислоту, приблизительно 5-10% об./об. пропиленгликоля (CAS no. 57-55-6), приблизительно 10-20% об./об. низшего спирта и приблизительно 5-10% об./об. неионного гидрофильного поверхностно-активного вещества.

Предпочтительно органическая кислота представляет собой слабую органическую кислоту, такую как карбоновая кислота. Термин "слабая органическая кислота" следует понимать как означающий органическую кислоту, имеющую pK_a (логарифмическая константа диссоциации кислоты) в интервале от -2 до 12. Предпочтительно, слабая органическая кислота имеет pK_a в интервале от 1 до 10, или от 2 до 5, или даже от 3 до 4. Слабая органическая кислота может представлять собой, но не ограничивается этим, любую карбоновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из щавелевой кислоты (этандиовая кислота), лимонной кислоты (2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота), яблочной кислоты (2-гидроксипропан-2,3-дикарбоновая кислота), угольной кислоты (гидроксиметановая кислота), бензойной кислоты (бензолкарбоновая кислота или фенилметановая кислота), муравьиной кислоты (метановая кислота), молочной кислоты (2-гидроксипропановая кислота), уксусной кислоты (этановая кислота), масляной кислоты (бутановая кислота), валериановой кислоты (пентановая кислота), капроновой кислоты (гексановая кислота) и пропионовой кислоты (пропановая кислота). Наиболее предпочтительно, органическая кислота представляет собой лимонную кислоту.

Органическая кислота может присутствовать в водном растворе при концентрациях в пределах от приблизительно 0,008 до 0,25М, или от приблизительно 0,01 до 0,2М, или от 0,05 до 0,1М. Композиция для восстановления по изобретению, включающая 60-80%, или 65%-75%, или 67%-72%, или приблизительно 70% указанного водного раствора предпочтительно имеет конечную концентрацию указанной органической кислоты в пределах от 0,05 до 0,2М, от 0,006 до 0,16М, от 0,008 до 0,12М, от 0,03 до 0,08М или предпочтительно от 0,04 до 0,6М.

Низший спирт в настоящем изобретении означает органическое соединение, содержащее гидроксильную функциональную группу, связанную с насыщенным атомом углерода низшей алкильной или низшей замещенной алкильной группы, где низшая алкильная или низшая замещенная алкильная группа содержит не больше чем 6 атомом углерода и предпочтительно имеет структуру $CH_3-(CH_2)_n-OH$, где $n=1, 2, 3, 4$ или 5. Предпочтительно низший спирт выбран из группы, состоящей из метанола, этанола, пропанола, бутанола и пентанола, наиболее предпочтительно низший спирт представляет собой этанол.

Неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество предпочтительно имеет значение гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) в интервале от 9 до 14, более предпочтительно от 12 до 14. Это поверхностно-активное вещество может представлять собой, но не ограничивается этим, этоксилирован-

ный моно- (в частности, 5 этокси групп), ди- или три- (в частности, 20 этокси групп) сложный эфир сорбитана и жирной кислоты, где жирная кислота предпочтительно выбрана из группы, состоящей из олеата (например, этоксилированный сорбитанмоноолеат, такой как Tween 81® и/или этоксилированный сорбитантриолеат, такой как Tween 85®), пальмитата, стеарата (например, этоксилированный сорбитантристеарат, такой как Tween 65®), изостеарата, лаурата и их комбинаций; этоксилированных жирных спиртов (в частности, 5-10 этокси групп) (например, Brij 76®, Brij 56®, Brij 96®), этоксилированных жирных кислот (в частности, 5-10 этокси групп) (например, Simulsol 2599®, Myrj 45®), этоксилированного касторового масла (в частности, 25-35 этокси групп) (например, Arlatone 650®, Arlatone G®, Cremophor EL®) и их комбинаций.

В одном варианте композиции по изобретению неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество:

а) представляет собой моно-, ди- или триглицерид, предпочтительно этоксилированный триглицерид, и/или

б) имеет значение гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) в интервале от 9 до 14.

Значение ГЛБ рассчитывают с использованием формулы $ГЛБ = 20 (1 - I_s/I_a)$, в которой I_s представляет собой коэффициент омыления или значение омыления, и I_a представляет собой кислотное число или коэффициент кислотности указанного поверхностно-активного вещества или указанной смеси поверхностно-активных веществ. Эти два показателя, омыления и кислотности, определяют способами, описанными в Европейской Фармакопее (Издание 8.8, раздел 2.5.6 и 2.5.1 соответственно).

В предпочтительном варианте осуществления неионные гидрофильные поверхностно-активные вещества представляют собой этоксилированное касторовое масло, более конкретно, полиоксил 35 гидрогенизированное касторовое масло или полиоксиэтиленглицеринтририцинолеат 35 (CAS № 61791-12-6) (например, Cremophor EL®), который представляет собой смесь полиоксиэтилированных триглицеридов, полученную путем взаимодействия касторового масла с этиленоксидом в молярном соотношении 1:35.

Предпочтительно восстанавливающая композиция по изобретению включает или состоит из приблизительно 75% об./об. водного раствора, включающего приблизительно 0,1М лимонной кислоты в воде, приблизительно 6,25% об./об. пропиленгликоля (CAS № 57-55-6), приблизительно 12,5% об./об. этанола и приблизительно 6,25% об./об. полиоксиэтиленглицеринтририцинолеата 35 (CAS № 61791-12-6). Другими словами, композиция для восстановления включает или состоит из приблизительно 0,075М лимонной кислоты, приблизительно 6,25% об./об. пропиленгликоля (CAS № 57-55-6), приблизительно 12,5% об./об. этанола и приблизительно 6,25% об./об. полиоксиэтиленглицеринтририцинолеата 35 (CAS № 61791-12-6) в воде.

Также предпочтительной является композиция для восстановления, включающая или состоящая из приблизительно 75% об./об. водного раствора, включающего приблизительно 0,1М лимонной кислоты в воде, приблизительно 6,25% об./об. пропиленгликоля (CAS no. 57-55-6), приблизительно 12,5% об./об. этанола, приблизительно 6,25% об./об. полиоксиэтиленглицеринтририцинолеата 35 (CAS no. 61791-12-6) и 20 мкг/мл CpG ODN182 6, или включающая или состоящая из приблизительно 0,075М лимонной кислоты, приблизительно 6,25% об./об. пропиленгликоля (CAS no. 57-55-6), приблизительно 12,5% об./об. этанола, приблизительно 6,25% об./об. полиоксиэтиленглицеринтририцинолеата 35 (CAS no. 61791-12-6) и 20 мкг/мл CpG ODN1826 в воде.

Композиция для восстановления является особенно подходящей для восстановления хранимых пептидов, как определено в настоящем изобретении ниже в разделе Фармацевтическая композиция, т.е. предпочтительно имеющих длину от 15 до 100 аминокислот. В данной области признается трудность образования стабильных растворов при восстановлении пептидов, имеющих длину, определенную выше, особенно в случае разных пептидов, т.е. пептидов, имеющих разные аминокислотные последовательности и, следовательно, имеющих разные химические свойства и физические характеристики. Как результат, их трудно восстановить в одном и том же растворе. Кроме того, в случае, когда один или несколько из этих пептидов включает цистеины, имеет место тенденция к образованию SS-мостиков. Хотя внутримолекулярные дисульфидные связи могут потребоваться в вакцинных пептидах для того, чтобы они были иммуногенными, образование межмолекулярного дисульфидного мостика нежелательно, поскольку это приводит к нестабильным растворам.

Авторы настоящего изобретения определили, что композиция для восстановления по настоящему изобретению является особенно подходящей для получения высокостабильных восстановленных пептидных композиций, где количество межмолекулярных дисульфидных мостиков минимализировано, без какого-либо отрицательного влияния на иммуногенность восстановленных пептидов. Следовательно, композиция для восстановления по изобретению предотвращает образование межмолекулярных дисульфидных связей подлежащих восстановлению пептидов, как также определено в настоящем изобретении, на влияя на иммуногенность этих пептидов.

Предпочтительно композиция для восстановления по изобретению представляет собой стерильную и/или приемлемую для фармацевтического или клинического использования композицию, подходящую для парентерального введения пациенту, т.е. млекопитающему или человеку. Предпочтительно, компо-

зицию для восстановления по изобретению получают с использованием надлежащей производственной практики (GMP), и она имеет GMP качество, как определено European Medicines Agency и Food and Drug Administration. Композиция для восстановления по изобретению может быть упакована в сосуд. Изобретение также относится к сосуду, включающему объем композиции для восстановления, подходящий для восстановления одной фармацевтической единицы дозирования, как также определено в настоящем изобретении, или ее кратных единиц, т.е. объем, подходящий для восстановления 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более фармацевтических дозированных единиц. Предпочтительно, указанный сосуд хранят при температуре, при которой композиция для восстановления является стабильной в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев или 1 года или даже 2 лет. Предпочтительно указанная температура находится в интервале от -25 до 25°C, или от -23 до -18°C, или от 0 до 10°C, или от 2 до 8°C, или от 18 до 23°C.

Предпочтительно объем композиции для восстановления по изобретению, присутствующей в сосуде, составляет не более 50 мл, предпочтительно от 0,1 до 10 мл, предпочтительно от 1 до 10 мл, например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 мл, или имеющий любое промежуточное значение. Термин сосуд следует понимать как контейнер, который может иметь любую форму. Необязательно, под сосудом в настоящем изобретении подразумевается шприц.

Фармацевтическая композиция

Композиция для восстановления согласно изобретению является особенно подходящей для восстановления пептидов для получения лекарственного средства или фармацевтической композиции. Такая фармацевтическая композиция может представлять собой вакцину, предпочтительно пептидную вакцину. Под "вакциной" в настоящем изобретении следует понимать композицию, включающую антигенные соединения, необязательно дополненную другими иммуностимулирующими соединениями, для генерирования иммунитета для профилактики и/или лечения заболеваний, таких как состояния, ассоциированные с персистентной инфекцией, и/или метаплазией, и/или дисплазией, и/или неоплазией. "Вакцина на основе пептидов" или "пептидная вакцина" (эти термины используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо) следует понимать как вакцину, в которой пептиды составляют активные ингредиенты, т.е. антигенные соединения. Предпочтительно такие пептиды представляют собой синтетические длинные пептиды. Более предпочтительно, включающие человеческий лейкоцитарный антиген (HLA)-эпитопы, способные индуцировать CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеточные ответы.

Поэтому изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей пептиды, восстанавливаемые в композиции для восстановления по изобретению. Предпочтительно, фармацевтическая композиция по изобретению представляет собой вакцину, предпочтительно вакцину на основе пептидов. Такую вакцину на основе пептидов можно использовать для лечения персистирующих инфекций, предраковых состояний и рака, предпочтительно активируя клеточную иммунную систему для устранения инфицированных, предраковых и/или раковых клеток, которые экспрессируют вирусные антигены, опухоль-ассоциированные антигены, такие как раково-тестикулярные антигены и/или опухоль-специфические антигены, такие как онкогенные или неонкогенные вирусные антигены и/или неоантигены, являющиеся результатом мутаций ДНК.

Фармацевтическая композиция предпочтительно предназначена, и следовательно, составлена как подходящая для введения пациенту, предпочтительно человеку или животному.

Предпочтительно введение является парентеральным, например, таким как внутривенное, подкожное, внутримышечное, интрадермальное, внутрикожное и/или интратуморальное введение, т.е. путем инъекции.

Авторы изобретения обнаружили, что композиция для восстановления, включающая восстановленные пептиды, является особенно подходящей для смешивания с масляным адъювантом, что приводит к получению химически и физически стабильного раствора пептидной вакцины.

"Химически стабильный" в настоящем изобретении используется в контексте пептидного раствора и/или композиции пептидной вакцины, и это следует понимать как раствор или композицию, включающую пептиды, которые химически не разлагаются или не расщепляются, например, из-за образования внутри- или межмолекулярных дисульфидных мостиков, до неприемлемой степени; т.е. количество неразложившихся, нерасщепившихся и/или непрореагировавших пептидов в растворе и/или композиции составляет по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или даже 100 мас.%, по сравнению с исходным количеством после хранения раствора или композиции в течение по меньшей мере примерно 0,5, 1, 1,5, 2 или по меньшей мере 3 ч при комнатной температуре. Химическую стабильность можно оценить с использованием любого подходящего метода, известного в данной области, например, метода ВЭЖХ/МС. Когда используют ВЭЖХ/МС, раствор/композицию определяют как химически стабильные, если общий % площади новых пиков, появляющихся после хранения по меньшей мере в течение примерно 0,5, 1, 1,5, 2 или по меньшей мере 3 ч при комнатной температуре, составляет не более 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0% по сравнению с исходным, где новые пики следует понимать как пики на ВЭЖХ хроматограммах хранимого раствора, которые не были идентифицированы на ВЭЖХ хроматограммах исходного раствора ("исходный" в настоящем изобретении следует понимать как свежеполученный раствор непосредственно после приготовления), при измерении в тех же условиях. Предпочтительно общая площадь новых пиков, появляющихся после хранения в течение 3 ч при комнатной темпе-

ратуре, составляет не более 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%, предпочтительно не более 10% по сравнению с исходным значением при измерении в тех же условиях.

Термин "физически стабильный" в настоящем изобретении используется в контексте пептидного раствора и/или композиции пептидной вакцины, и это следует понимать как раствор или композицию, включающую пептиды, которые не осаждаются или повторно не диспергируются. Физическую стабильность можно оценить с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники, например, путем визуального осмотра или анализа распределения частиц с использованием Malvern Mastersizer, как проиллюстрировано в настоящем изобретении, где средний размер частиц выражен как D (0,5). При использовании Malvern Mastersizer для оценки физической стабильности, как проиллюстрировано в настоящем изобретении, раствор/композиция определяются как физически стабильные, если среднее значение D (0,5) после хранения по меньшей мере в течение примерно 0,5, 1, 1,5, 2 или по меньшей мере 3 ч при комнатной температуре повышается максимум на 50, 40, 30, 20, 10 или 5% по сравнению с исходным (т.е. свежеполученным раствором непосредственно после приготовления). Предпочтительно, раствор/композицию определяют как физически стабильные, если среднее значение D (0,5) после хранения в течение 3 ч при комнатной температуре повышается не более чем на 50, 40, 30, 20, 10 или 5%, предпочтительно не более чем на 20% по сравнению с исходным значением.

Предпочтительно фармацевтическая композиция по изобретению дополнительно содержит адъювант. Термин "адъювант" используется в настоящем изобретении для обозначения веществ, которые обладают иммуно-потенцирующим эффектом и которые добавляют или составляют совместно с антигенным средством для усиления, индукции, вызова и/или модуляции иммунного ответа против антигенного средства при введении пациенту. Масляные адъюванты можно использовать для образования эмульсий (например, эмульсий вода-в-масле или масло-в-воде), и в данной области техники они признаны как усиливающие и направляющие иммунный ответ. Присутствие такого адъюванта в терапевтической вакцине очень полезно. Поэтому настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции или лекарственному средству, включающему или состоящему из композиции для восстановления по изобретению, восстановленных пептидов и масляного адъюванта, более конкретно, изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей приблизительно 0,5-10 мг/мл пептидов в примерно 40-60% об./об. композиции для восстановления согласно изобретению и примерно 40-60% об./об. масляного адъюванта.

Масляный адъювант может представлять собой любой минеральный или не-минеральный масляный адъювант, известный в данной области техники. Предпочтительно масляный адъювант представляет собой минеральный масляный адъювант.

Неограничивающие примеры масляных адъювантов включают адъюванты на основе масел биологического происхождения (на основе растительного масла/рыбьего жира и т.д.), адъювант на основе сквалена (например, MF59), композицию адъюванта Syntex (SAF; Lidgate, Deborah M, Preparation of the Syntex Adjuvant Formulation (SAF, SAF-m и SAF-1), в: Vaccine Adjuvants, Volume 42 серии Methods in Molecular Medicine™ p229-237, ISSN1543-1894), полный адъювант Фрейнда (FCA), неполный адъювант Фрейнда (FIA), адъюванты на основе арахисового масла (например, Адъювант 65), Lipovant (Byars, N.E., Allison, A. C, 1990. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations. In: Zola, H. (Ed.), Laboratory Methods in Immunology. p39-51), ASO4 (A. Tagliabue, R. Rappuoli Vaccine adjuvants: the dream becomes real Hum. Vaccine, 4 (5), 2008, p347-349), адъюванты Montanide на основе очищенного сквалена и сквалена, эмульгированного с высокочистым маннидмоноолеатом (например, Montanide ISA 25 VG, 28 VG, 35 VG, 50 V, 50 V2, 51 VG, 61 VG, 70 VG, 70 M VG, 71 VG, 720 VG, 760 VG, 763 A VG, 775 VG, 780 VG, 201 VG, 206 VG, 207 VG). Предпочтительно масляный адъювант представляет собой минеральный масляный адъювант. Более предпочтительно масляный адъювант представляет собой Montanide ISA 51VG (Seppic), который представляет собой смесь Drakeol VR и маннидмоноолеата.

Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит или состоит из количества пептидов, которое составляет фармацевтическую единицу дозирования. Фармацевтическая дозированная единица определяется в настоящем изобретении как количество активных ингредиентов (т.е. общее количество пептидов в пептидной вакцине), которое вводят пациенту в данный момент времени. Фармацевтическую единицу можно вводить пациенту в одном объеме, т.е. в одной инъекции, или можно вводить в 2, 3, 4, 5 или более отдельных объемах или инъекциях, которые предпочтительно вводят на разных участках тела, например, в правую и левую конечности. Причин для введения одной фармацевтической единицы дозирования в отдельных объемах может быть множество, например, чтобы избежать негативных побочных эффектов, избежать антигенной конкуренции и/или по соображениям, связанным с анализом композиции. Должно быть понятно, что отдельные объемы фармацевтической дозы могут различаться по составу, т.е. могут включать различные виды или композиции активных ингредиентов и/или адъювантов. Должно быть понятно, что для всех активных ингредиентов (антигенных пептидов) в фармацевтической дозированной единице в целом используется одна композиция для восстановления, поскольку одно из преимуществ изобретения состоит в том, что композиция для восстановления по изобретению подходит для восстановления, и последующего эмульгирования с использованием масляного адъюванта, различных пептидных смесей. Одна единственная композиция для восстановления и предпочтительно один

единственный масляный адъювант сводят к минимуму вероятность того, что человек не сможет осуществить восстановление и эмульгирование.

Объем одной инъекции или введения (т.е. объем, вводимый в одно место в определенный момент времени), включающий суммарную фармацевтическую дозу, или ее часть в случае нескольких введений по существу в этот же момент времени, может быть в интервале от 100 мкл до 2 мл или от 100 мкл до 1 мл. Объем одной инъекции может быть 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 400 мкл, 500 мкл, 600 мкл, 700 мкл, 800 мкл, 900 мкл, 1 мл, 1,1 мл, 1,2 мл, 1,3 мл, 1,4 мл, 1,5 мл, 1,6 мл, 1,7 мл, 1,8 мл, 1,9 мл, 2 мл, 3 мл, или объем, имеющий любое промежуточное значение.

Фармацевтическая единица дозирования может представлять собой эффективное количество или часть эффективного количества. "Эффективное количество" следует понимать как количество или дозу активных ингредиентов, необходимых для предотвращения и/или уменьшения симптомов заболевания (например, хронической инфекции, предракового состояния и/или рака) по сравнению с не получавшим лечение пациентом. Эффективное количество активного соединения(соединений), используемого для практического применения настоящего изобретения для профилактического и/или терапевтического лечения заболевания или состояния, варьируется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья пациента. В конечном итоге лечащий врач или ветеринар определит подходящее количество и режим дозирования. Такое количество называется "эффективным" количеством. Это эффективное количество может также представлять собой количество, которое способно индуцировать эффективный клеточный Т-клеточный ответ у пациента, подлежащего лечению, или, более предпочтительно, эффективный системный клеточный Т-клеточный ответ.

Предпочтительно фармацевтическая единица дозирования, или общее количество пептидов, вводимое пациенту в определенный момент времени, либо в виде одной, либо нескольких инъекций в определенный момент времени, включает количество пептидов в пределах от 0,1 мкг до 20 мг, такое как приблизительно 0,1 мкг, 0,5 мкг, 1 мкг, 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 30 мкг, 40 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 150 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 650 мкг, 700 мкг, 750 мкг, 800 мкг, 850 мкг, 900 мкг, 1 мг, 1,5 мг, 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 3,5 мг, 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 5,5 мг, 6 мг, 6,5 мг, 7 мг, 7,5 мг, 8 мг, 8,5 мг, 9 мг, 9,5 мг, 10 мг, 15 мг или приблизительно 20 мг или любое промежуточное количество. Предпочтительные пределы для фармацевтических единиц дозирования составляют от 0,1 мкг до 20 мг, от 1 мкг до 10 мг, от 10 мкг до 5 мг, от 0,5 мг до 2 мг, от 0,5 мг до 10 мг или от 1 мг до 5 мг или от 2 до 4 мг.

Предпочтительно фармацевтическая композиция включает или состоит из приблизительно 1-2 мг/мл пептидов в 40-60% об./об. композиции для восстановления, определенной выше, и 40-60% об./об. масляного адъюванта. Фармацевтическая композиция может включать или состоять из приблизительно 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59 или 60% об./об. масляного адъюванта. Предпочтительно фармацевтическая композиция включает или состоит из приблизительно 1-2 мг/мл пептидов в приблизительно 50% об./об. композиции для восстановления, определенной выше, и приблизительно 50% об./об. масляного адъюванта, предпочтительно Montanide ISA 51 VG (Seppic). Другими словами, фармацевтическая композиция предпочтительно включает или состоит из приблизительно 1-2 мг/мл пептида, 0,038М лимонной кислоты, приблизительно 3,13% об./об. пропиленгликоля (CAS no. 57-55-6), приблизительно 6,25% об./об. этанола, приблизительно 3,13% об./об. полиоксиэтиленглицеринтририцинолеата 35 (CAS no. 61791-12-6) и приблизительно 50% масляного адъюванта, предпочтительно Montanide ISA 51 VG (Seppic), в воде.

Фармацевтическая композиция по изобретению может включать одно или несколько дополнительных стимулирующих иммунный ответ соединений или адъювантов. Предпочтительно лекарственное средство по изобретению может дополнительно включать один или несколько синтетических адъювантов. Такое дополнительное стимулирующее иммунный ответ соединение или адъювант могут быть

(i) смешаны с фармацевтической композицией по изобретению после восстановления пептидов и необязательного эмульгирования с масляным адъювантом, как определено выше,

(ii) могут быть частью композиции для восстановления по изобретению, определенной выше,

(iii) могут быть физически связаны с пептидом(пептидами), подлежащим восстановлению, или

(iv) их можно отдельно вводить пациенту, млекопитающему или человеку, подлежащему лечению.

Должно быть понятно, что, когда соединение, стимулирующее иммунный ответ, смешивают с лекарственным средством в соответствии с изобретением, его называют адъювантом; в случае отдельного введения, его называют иммуномодулирующим средством или иммуномодулятором, и эти термины используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Особенно предпочтительными являются адъюванты, которые, как известно, действуют через Toll-подобные рецепторы и/или через RIG-I (Ретиноевая кислота-Индуктируемый Ген-1) белок и/или через эндотелиновый рецептор.

Иммуномодифицирующие соединения, которые способны активировать врожденную иммунную систему, могут особенно хорошо активироваться через Toll-подобные рецепторы (TLR), включая TLR 1-10. Соединения, способные активировать TLR рецепторы и их модификации и производные подробно описаны в документах предшествующего уровня техники. TLR1 может активироваться бактериальными липопротеинами и их ацетилированными формами, TLR2, кроме того, может активироваться грам-

положительными бактериальными гликолипидами, LPS, LPA, LTA, фимбриями, белками наружной мембраны, белками теплового шока бактерий или хозяина и микобактериальными липоарабиноманнанами. TLR3 может активироваться дцПНК, в частности вирусного происхождения, или химическим соединением поли(I:C). TLR4 может активироваться грам-отрицательными LPS, LTA, белками теплового шока хозяина или бактериального происхождения, белками вирусной оболочки, таксомом или его производными, гиалуронан-содержащими олигосахаридами и фибронектинами. TLR5 может активироваться бактериальными жгутиками или жгутиком. TLR6 может активироваться микобактериальными липопотеинами и термолабильным растворимым фактором группы В Streptococcus (GBS-F) или модулинами Staphylococcus. TLR7 может активироваться имидазохинолинами, такими как имиквимод, резиквимод и производные имиквимода или резиквимода (например, 3М-052). TLR9 может активироваться неметилированными CpG ДНК или хроматин-IgG комплексами. В частности, TLR3, TLR7 и TLR9 играют важную роль в опосредовании врожденного иммунного ответа против вирусных инфекций, и соединения, способные активировать эти рецепторы, особенно предпочтительны в композициях или лекарственных средствах согласно изобретению. Особенно предпочтительные адъюванты включают, но не ограничиваются этим, синтетически полученные соединения, включающие дцПНК, поли(I:C), поли I:CLC, неметилированные CpG ДНК, которые запускают TLR3 и TLR9 рецепторы, IC31, агонист TLR 9, IMSAVAC, агонист TLR 4, Montanide ISA-51, Montanide ISA 720 (адъювант, производимый Seppic, Франция). Известно, что белок RIG-I активируется дц-ПНК, также как и TLR3 (Kato et al., (2005) Immunity, 1: 19-28). Особенно предпочтительным TLR лигандом является ram3cys и/или его производное, предпочтительно липопептид ram3cys или его вариант или производное, предпочтительно такое, как описано в WO 2013051936A1, более предпочтительно U-Pam12 или U-Pam14 или AMPLIVANT®. Другими предпочтительными адъювантами являются циклические динуклеотиды (CDN), мурамилдипептид (MDP) и поли-ICLC. В предпочтительном варианте осуществления адъюванты по изобретению представляют собой не встречающиеся в природе адъюванты, такие как производное липопептида ram3cys, как описано в WO 2013051936A1, Poly-ICLC, имидазохинолин, такой как имиквимод, резиквимод или его производные, CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG-ODN), имеющие последовательность неприродного происхождения, и пептидные адъюванты, такие как мурамилдипептид (MDP) или пептид столбнячного анатоксина, включающие не встречающиеся в природе аминокислоты. Также предпочтительными являются адъюванты, выбранные из группы, состоящей из следующих: 1018 ISS, соли алюминия, Amplivax, AS 15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, ImuFact EV1P321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, монофосфорилилипид A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, PepTel.RTM, векторная система, PLGA микрочастицы, SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, Pam3Cys-GDPKHPKSF, YF-17D, VEGF ловушка, R848, бета-глюкан, Aquila QS21 стимулон, вадимезан, агонист AsA404 (DMXAA), STING (стимулятор IFN генов), агонист (например, c-di-GMP VacciGrade™), PCI, агонист NKT (природные киллерные Т-клетки) (например, альфа-галактозилцерамид или альфа-GalCer, RNAjuvant® (Curevac), лиганды индуцируемого ретиноевой кислотой белка I, (например, 3pPNC или 5'-трифосфат ПНК).

Как указано выше, адъювант может быть физически связан с пептидом(пептидами), подлежащим восстановлению. Физическая связь адъювантов и костимулирующих соединений или функциональных групп с антигенными пептидами, как определено в настоящем описании ниже, обеспечивает усиленный иммунный ответ за счет улучшенного нацеливания на антиген-презентирующие клетки, в частности на дендритные клетки, которые интернализуют, метаболизируют и презентуют антиген, и одновременной стимуляции таких клеток для активирования экспрессии различных костимулирующих молекул, становясь эффективными клетками, индуцирующими и усиливающими Т-клеточный ответ. Другое предпочтительное иммуномодифицирующее соединение представляет собой ингибитор эндотелинового рецептора, такой как BQ-788 (Buckanovich RJ et al., (2008) Nature Medicine 14: 28; Ishikawa K, (1994) PNAS 91: 4892) и/или его производные. BQ-788 представляет собой N-цис-2,6-диметилпиперидинокарбонил-L-гамма-метиллейцил-D-1-метоксикарбонилтриптофанил-D-норлейцин. Другим предпочтительным стимулирующим иммунный ответ соединением или адъювантом является интерферон альфа (IFN α), более предпочтительно пегилированный интерферон альфа. Кроме того, предпочтительным является использование (ко)стимулирующих молекул антигенпрезентирующих клеток, как изложено в WO 99/61065 и WO 03/084999, в сочетании с пептидами и композициями по изобретению. В частности, использование 4-1BB и/или CD40 лигандов, агонистических антител, OX40 лигандов, CD27 лигандов или их функциональных фрагментов и производных, а также синтетических соединений с подобной агонистической активностью является предпочтительным для введения отдельно или в сочетании с пептидами по изобретению пациентам, подлежащим лечению, чтобы дополнительно стимулировать формирование оптимального иммунного ответа у пациента.

Пептиды, подлежащие восстановлению, в композиции для восстановления по изобретению и/или содержащиеся в фармацевтической композиции по изобретению, предпочтительно имеют длину от приблизительно 15 до приблизительно 100 аминокислот. Предпочтительно, пептиды, подлежащие восстановлению, имеют длину между 15-100 аминокислот, или 15-95 аминокислот, или 15-90 аминокислот, или

15-85 аминокислот, или 15-70 аминокислот, или 15-65 аминокислот, или 15-60 аминокислот, или 15-55 аминокислот, или 15-50 аминокислот, или 15-45 аминокислот, или 15-40 аминокислот, или 17-39 аминокислот, или 19-43 аминокислот, или 22-40 аминокислот, или 22-45 аминокислот, или 28-40 аминокислот, или 30-39 аминокислот. Предпочтительно, пептиды, подлежащие восстановлению, имеют длину не более 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 или 30 аминокислот. Предпочтительно, пептиды, подлежащие восстановлению, имеют длину по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислот. Предпочтительно пептиды, подлежащие восстановлению, имеют длину по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислот и не более чем 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 или 30 аминокислот, или включают любую комбинацию, находящуюся в этих пределах.

Пептиды, подлежащие восстановлению, в композиции для восстановления по изобретению и/или содержащиеся в фармацевтической композиции по изобретению, могут представлять собой пептиды, происходящие из белковых антигенов. "Белковый антиген" следует понимать как белок или полипептид, который включает антигенные области, способные индуцировать иммунный ответ у хозяина, такого как животное или человек. Белковые антигены, которые специфически экспрессируются инфицированными, предраковыми и/или раковыми клетками, являются подходящими мишенями для терапевтических вакцин. Такие белковые антигены могут быть вирусными или не-вирусными антигенами. Примерами вирусных антигенов, которые являются мишенями для профилактических и терапевтических вакцин, являются антигены, происходящие из индуцированной вирусом Эпштейна-Бара лимфомы (EBV), Т-лимфотрофного вируса I человека, вируса гепатита В (HBV), вируса папилломы человека (HPV), вируса саркомы Капоши (KSHV), вируса гепатита С (HVC), KSV и вируса карциномы из клеток Меркеля. Неограничивающими примерами вирусных белковых антигенов являются белковые антигены из EBV, например, LMP1 или поздний мембранный белок 1 (например, UniprotKB P03230) и LMP2 или поздний мембранный белок 2 (например, UniprotKB P13285); белковые антигены из человеческого Т-лимфотрофного вируса I, например, Тах белок (например, UniprotKB P14079; P0C213; P03409); белковые антигены из HBV, например, генотипы А, В, С или D, например, белок HBsAg (например, UniprotKB Q773S4), Х-белок (например, UniprotKB Q8V1H6), большой оболочечный белок (например, UniprotKB P03138) и капсидный белок (например, UniprotKB P03147); белковые антигены из HCV, например, геномный полипротеин (например, UniprotKB P26663; Q99IB8; A3EZI9) и HCV белок (например, UniprotKB Q99398); белковые антигены из HPV, например, онкогенные генотипы 6, 11, 16 или 18, например, онкопротеин Е6 (например, UniprotKB P03126; P06463) и онкопротеин Е7 (например, UniprotKB P03129; P06788), белковые антигены из KSHV, например, белок ORF36 (например, UniprotKB F5HGH5), коровий белок семейства генов UL42 (например, UniprotKB Q77ZG5), гомолог белка выхода вириона UL31 (например, UniprotKB), гомолог триплексного капсидного белка VP19C (например, UniprotKB F5H8Y5), вирусный макрофагальный воспалительный белок 2 (например, UniprotKB Q98157), гомолог мРНК экспорт-фактора ICP27 (например, UniprotKB Q2HR75), ORF52 (например, UniprotKB F5HBL8), вирусный IRF4-подобный белок (например, UniprotKB Q2HR73), Bcl-2 (например, UniprotKB Q76RI8), деметилаза большого покровного белка (например, UniprotKB Q2HR64), V-циклин (например, UniprotKB Q04946), VIRF-1 (например, UniprotKB F5HF68) и Е3 убиквитин-протеинлигаза MIR1 (например, UniprotKB P90405) и антигенный белок вируса карциномы из клеток Меркеля, например, большой Т белок (например, UniprotKB E2IPT4; K4P159), например, малый Т белок (например, UniprotKB B6DVX0; B6DVX6).

Невирусные антигены, которые являются подходящими мишенями для профилактических и терапевтических вакцин, могут быть опухоль-специфическими антигенами и/или опухоль-ассоциированными антигенами. Опухоль-специфичные антигены представляют собой антигены, которые экспрессируются исключительно опухолевыми клетками, а не какими-либо другими клетками, и часто представляют собой мутантные белки, такие как Kras^{G12D} и мутантный P53, или неоантигены, развивающиеся со временем в результате ДНК мутаций и нарушения функционирования механизмов репарации ДНК. Опухоль-ассоциированные антигены представляют собой эндогенные антигены, присутствующие как в опухолевых, так и в нормальных клетках, но с дисрегуляцией их экспрессии или клеточной локализации, такие как HER-2/neu рецептор. Неограничивающими примерами таких не-вирусных антигенов, которые могут быть мишенями для терапевтических вакцин, являются Her-2/neu (или ErbB-2, рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (например, UniprotKB P04626); WT-1 или белок опухоли Вильмса (например, UniprotKB P19544); NY-ESO-1 или раковый/тестикулярный антиген 1 (например, UniprotKB P78358); MAGE-A3 или меланома-ассоциированный антиген-A3 (например, UniprotKB P43357); BAGE или антиген В меланомы (например, UniprotKB Q13072); CEA или карциноэмбриональный антиген (например, UniprotKB Q13984); AFP или α -фетопропротеин (например, UniprotKB P02771); XAGE-1B или член 1 семейства X антигенов (например, UniprotKB Q9HD64); сурвивин или BIRC5, бакуловирусный IAP-повтор-содержащий белок 5 (например, UniprotKB Q15392); P53 (например, UniprotKB P04637);

h-TERT или обратная транскриптаза теломеразы (например, UniprotKB 014746); мезотелин (например, UniProtKB H3BR90); PRAME или антиген меланомы, преимущественно экспрессируемый в опухолях (например, UniprotKB P78395); MUC-1 или муцин-1 (например, UniprotKB P15941); Mart-1/Melan-A или антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками 1 (например, UniprotKB Q16655); GP-100 или меланоцитарный белок PMEL (например, UniprotKB P40967); тирозиназа (например, UniprotKB U3M8N0); тирозиназа-родственный белок-1 (например, UniprotKB P17643); тирозиназа-родственный белок-2 (например, UniprotKB 075767); PAP или PAPOLA, поли (А) полимеразы альфа (например, UniprotKB P51003); PSA или простата-специфический антиген (например, UniprotKB P07288); PSMA или простата-специфический мембранный антиген, или глутамат карбоксипептидаза 2 (например, UniprotKB Q04609).

Предпочтительными опухоль-специфическими мишенями для пептидных вакцин являются вирусные онкогены и неоантигены. "Нео-антиген" следует понимать как опухолевый антиген, который возникает в результате опухоль-специфической мутации(мутаций), которая изменяет аминокислотную последовательность геном-кодируемых белков. Нео-антигены могут быть идентифицированы путем секвенирования целого генома, выявляя все или почти все мутированные нео-антигены, которые уникально присутствуют при раке (или неоплазии или опухоли) конкретного пациента. Эта коллекция мутированных нео-антигенов может быть проанализирована для идентификации специфической, оптимизированной подгруппы мутированных нео-эпитопов для использования в качестве источника антигена для разработки персонализированной противораковой вакцины для лечения рака у пациента. Способы идентификации таких нео-антигенов описаны в WO 2014/168874, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки.

Пептиды, "происходящие" из антигенного белка, следует понимать как включающие непрерывную аминокислотную последовательность, выбранную из антигенного белка, которая может быть модифицирована путем делеции или замены одной или нескольких аминокислот путем удлинения по N- и/или C-концу дополнительными аминокислотами или функциональными группами, которые могут улучшать биодоступность, нацеливание на Т-клетки или включать или высвобождать иммуномодулирующие вещества, которые обеспечивают адъювантные или (ко)стимулирующие функции.

Пептид, подлежащий восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию, может включать или состоять из не встречающейся в природе последовательности в результате синтеза неестественных длин или в результате включения дополнительных аминокислот, не происходящих из белкового антигена, где пептид получен для и/или является результатом включения модифицированной аминокислоты и/или не встречающейся в природе аминокислоты и/или ковалентно связанной функциональной группы, такой как фторированная группа, фторуглеродная группа, лиганд и/или агонист человеческого toll-подобного рецептора, олигонуклеотидный конъюгат, PSA, цепи сахаров или гликан, ram3cys и/или его производное, предпочтительно такое, как описано в WO 2013051936A1, CpG-олигонуклеотиды (CpG-ODNs), циклические динуклеотиды (CDNs), DC импульсная кассета, пептид, происходящий из столбнячного токсина, пептид, происходящий из человеческого HMGB1; либо в самом пептиде, либо присоединенные к пептиду, как указано выше. Пептид по изобретению может включать 2-аминоизомасляную кислоту (Abu, изомера цистеина). Цистеин пептида по изобретению может быть заменен на Abu.

Предпочтительно пептид, подлежащий восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, представляет собой выделенный пептид, где "выделенный" не отражает степень, до которой пептид очищен, но указывает, что пептид был выделен из его естественной среды (т.е. который подвергался манипуляции человеком), и может быть рекомбинантно полученным пептидом или синтетическим полученным пептидом.

Использование относительно коротких пептидов является чрезвычайно предпочтительным для медицинских целей, поскольку они могут быть эффективно синтезированы *in vitro*, что невозможно или неэкономично для нативных белков размером больше чем примерно 100, т.е. 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 аминокислот. Химический синтез пептидов является обычной практикой, и специалисту в данной области техники известны различные подходящие способы. Химический синтез пептидов также преодолевает проблемы, связанные с рекомбинантной продукцией интактных белков, которую трудно стандартизировать и для которой требуется существенная очистка и контроль качества.

Пептиды с длиной, превышающей длину эпитопов человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I и класса II (например, имеющие длину, указанную в настоящем изобретении для пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению), являются особенно предпочтительными для использования в качестве компонента вакцины, поскольку они достаточно большие, чтобы быть поглощенными профессиональными антиген-презентирующими клетками (APC), в частности, дендритными клетками (DC), как объясняется в WO 02/070006, и процессироваться в DC до презентации на клеточной поверхности содержащихся HLA класс I-презентируемых и HLA класс II-презентируемых эпитопов. Следовательно, неблагоприятная индукция Т-клеточной толерантности системной презентацией минимальных HLA класс I-презентируемых эпитопов на не презентующих антиген клетках (как показано в Toes et al., Proc Natl Acad Sci (1996) USA 93 (15): 7855 и Toes et al., Immunol (1996) 156 (10): 3911) предотвращается при применении пептидов, превышающих длину эпитопов

человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I и класса II (как показано в Zwaveling et al., J. Immunol. (2002) 169: 350-358). По сравнению с вакцинацией пептидами, имеющими длину, указанную в настоящем описании для пептидов, которые должны быть восстановлены и/или включены в фармацевтическую композицию по изобретению, терапевтическая вакцинация полноразмерными белками, вероятно, будет менее эффективной (Rosalia et al., Eur. J Immunol (2013) 43: 2554-2565).

Пептиды, которые должны быть восстановлены и/или включены в фармацевтическую композицию по изобретению, предпочтительно представляют собой пептиды длиной от приблизительно 15 до приблизительно 100 аминокислот, также указанные в настоящем изобретении как длинные пептиды, каждый из которых превышает длину эпитопов, презентируемых человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) класса I класса II, и которые либо как таковые, либо в смеси, вызывают комбинированный CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный ответ, который является терапевтически успешным и стимулирует излечение большого процента пациентов. Предпочтительно длинные пептиды по изобретению представляют собой синтетические пептиды, указанные в настоящем изобретении как синтетические длинные пептиды (SLP).

"CTL эпитоп" понимается в настоящем изобретении как линейный фрагмент полипептидного антигена, который высвобождается из исходного белка путем протеасома-опосредованного протеолитического расщепления и затем презентируется молекулой HLA класса I на клеточной поверхности антиген-презентирующей клетки (APC), предпочтительно человеческой антиген-презентирующей клетки. CTL эпитоп по изобретению предпочтительно способен активировать CD8⁺ Т-клеточный ответ. CTL эпитоп типично включает по меньшей мере 8 вплоть до 12, или в исключительных случаях до 13 или 14 аминокислот. Предпочтительно CTL эпитоп состоит из 8-14 аминокислот, т.е. имеет длину по меньшей мере от 8 до 14 аминокислот.

"Th-клеточный эпитоп" в настоящем изобретении означает линейный пептидный фрагмент, который распознается молекулой HLA класса II. Th-клеточный эпитоп способен индуцировать CD4⁺ Т-клеточный ответ. HLA класса II-рестриктурированный CD4⁺ Th-клеточный эпитоп типично включает от 15 до 20, или в исключительных случаях даже больше, аминокислот. Предпочтительно, HLA класса II-рестриктурированный CD4⁺ Th-клеточный эпитоп включает 10-20 или 10-15 аминокислот.

Наиболее предпочтительно Th-клеточный эпитоп пептида, подлежащего восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, способен активировать ответ CD4⁺ Т-хелперов памяти и/или эффекторных CD4⁺ Т-хелперов, т.е. активировать CD45RO-положительную CD4⁺ Т-хелперную клетку. Это приведет, благодаря сигналу "лицензии на уничтожение" через CD40-активирование DC (Lanzavecchia (1998) Nature, 393: 413), к более устойчивому цитотоксическому Т-клеточному ответу CD8⁺ эффекторных клеток и клеток памяти. В другом случае активированные CD4⁺ Т-хелперные клетки могут активировать не-HLA-рестриктурированные киллерные клетки иммунной системы.

В контексте настоящего изобретения "пептид, который включает не более 100 последовательных аминокислот из белкового антигена" означает, что количество последовательных аминокислот, происходящих из белкового антигена и присутствующих в пептиде, определенном в настоящем изобретении, составляет 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 или 30 аминокислот или меньше. В контексте настоящего изобретения "пептид, который включает по меньшей мере 15 последовательных аминокислот из белкового антигена" означает, что количество последовательных аминокислот, происходящих из белкового антигена и присутствующих в пептиде, определенном в настоящем изобретении, составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 или более аминокислот. В контексте настоящего изобретения "пептид, который включает 15-100 последовательных аминокислот из белкового антигена" означает, что количество последовательных аминокислот, происходящих из белкового антигена и присутствующих в пептиде, определенном в настоящем изобретении, составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 аминокислот и не более чем 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 или 30 аминокислот. Более предпочтительно, длина непрерывной аминокислотной последовательности из белкового антигена, содержащейся в пептиде, подлежащем восстановлению, составляет 15-100 аминокислот, или предпочтительно 15-95 аминокислот, или 15-90 аминокислот, или 15-85 аминокислот, или 15-70 аминокислот, или 15-25 аминокислот, или 15-60 аминокислот, или 15-55 аминокислот, или 15-50 аминокислот, еще более предпочтительно 15-45 аминокислот, еще более предпочтительно 15-40 аминокислот, еще более предпочтительно 17-39, еще более предпочтительно 19-43 аминокислот, еще более предпочтительно 22-40 аминокислот, еще более предпочтительно 28-40 и еще более предпочтительно 30-39 аминокислот.

Предпочтительно фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением не включает никаких пептидов, которые имеют оба из следующих свойств:

- a) процент основных аминокислотных остатков равен проценту кислых аминокислотных остатков,
- b) процент гидрофобных аминокислотных остатков составляет 48% или больше.

Для целей этого варианта осуществления, аминокислотные остатки классифицируются как "кислотные", "основные", "гидрофобные" или "нейтральные" следующим образом.

Аминокислота	Категория
Asp	Кислотная
Glu	Кислотная
Arg	Основная
Lys	Основная
His	Основная
Ala	Гидрофобная
Phe	Гидрофобная
Leu	Гидрофобная
Ile	Гидрофобная
Val	Гидрофобная
Tyr	Гидрофобная
Trp	Гидрофобная
Cys	Нейтральная
Gly	Нейтральная
Met	Нейтральная
Pro	Нейтральная
Asn	Нейтральная
Gln	Нейтральная
Ser	Нейтральная
Thr	Нейтральная

Пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению фармацевтическую композицию по изобретению, предпочтительно являются антигенными пептидами. "Антигенные пептиды" следует понимать как (высоко) иммуногенные и способные индуцировать сильный комбинированный антиген-направленный ответ $CD4^+$ Т-хелперов и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток при введении в виде вакцинной композиции пациенту, предпочтительно человеку или животному. Можно предсказать, что пептид будет иммуногенным и/или подтвердить, что он является иммуногенным, с использованием *in vitro* или *ex vivo* анализов или осуществляя испытаний *in vivo*, одобренных в данной области для установления иммуногенности. Предпочтительно, пептид можно эффективно использовать для предотвращения, частичного устранения и/или лечения или полного устранения антиген-связанного заболевания или состояния у пациента, предпочтительно определяемых по

активации или индукции иммунной системы и/или увеличению количества антиген-специфических активированных $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток в периферической крови или в тканях, как определяется при помощи анализа Elispot или тетрамерного окрашивания $CD4^+$ или $CD8^+$ Т клеток или повышения уровня цитокинов, продуцируемых этими Т-клетками, определяемого внутриклеточным окрашиванием цитокинов $CD4^+$ и $CD8^+$ Т клеток в проточной цитометрии после по меньшей мере одной недели лечения; и/или

ингибированию пролиферации антиген-связанной инфекции или определяемому уменьшению антиген-экспрессирующих клеток или снижению клеточной жизнеспособности антиген-экспрессирующих клеток; и/или

индукции или повышенной индукции клеточной гибели антиген-экспрессирующих клеток; и/или ингибированию или предотвращению увеличения антиген-экспрессирующих клеток.

В предпочтительном варианте осуществления вакцинная композиция по изобретению включает комбинацию пептидов, где указанная комбинация пептидов охватывает по меньшей мере 70, 80, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% HLA молекул I класса, которые кодируются HLA аллелями, преобладающими в популяции людей, которые являются пациентами, подлежащими лечению. HLA аллели, которые преобладают в популяции людей, которые являются пациентами, подлежащими лечению.

Предпочтительные эпитопы HLA класса I в пептидах в соответствии с изобретением представляют собой эпитопы, способные связываться с

HLA-A0101; HLA-A0201; HLA-A0206; HLA-A0301; HLA-A1101;
 HLAA2301; HLA-A2402; HLA-A2501; HLA-A2601; HLA-A2902; HLA-A3001;
 HLAA3002; HLA-A3101; HLA-A3201; HLA-A3303; HLA-A6801; HLA-A6802;
 HLAA7401; HLA-B0702; HLA-B0801; HLA-B1301; HLA-B1302; HLA-B1402;
 HLAB1501; HLA-B1502; HLA-B1525; HLA-B1801; HLA-B2702; HLA-B2705;
 HLAB3501; HLA-B3503; HLA-B3701; HLA-B3801; HLA-B3901; HLA-B4001;
 HLAB4002; HLA-B4402; HLA-B4403; HLA-B4601; HLA-B4801; HLA-B4901;
 HLAB5001; HLA-B5101; HLA-B5201; HLA-B5301; HLA-B5501; HLA-B5601;
 HLAB5701; HLA-B5801 и HLA-B5802.

В предпочтительном варианте осуществления пептид по изобретению охватывает по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% HLA молекул I класса, которые кодируются HLA аллелями, преобладающими в популяции людей, которые являются пациентами, подлежащими лечению, где "охватывают HLA молекулы класса I" подразумевает включение CTL эпитопа, который демонстрирует аффинность связывания, предпочтительно среднюю аффинность связывания, более предпочтительно высокую аффинность связывания с указанной HLA молекулой I класса. Предпочтительно пептид по изобретению охватывает по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% группы HLA молекул I класса, состоящей из

HLA-A0101; HLA-A0201; HLA-A0206; HLA-A0301; HLA-A1101; HLA-A2301; HLA-A2402; HLA-A2501; HLA-A2601; HLA-A2902;
 HLA-A3001; HLA-A3002; HLA-A3101; HLA-A3201; HLA-A3303; HLA-A6801; HLA-A6802; HLA-A7401; HLA-B0702; HLA-B0801; HLA-B1301;
 HLA-B1302; HLA-B1402; HLA-B1501; HLA-B1502; HLA-B1525; HLA-B1801; HLA-B2702; HLA-B2705; HLA-B3501; HLA-B3503; HLA-B3701;
 HLA-B3801; HLA-B3901; HLA-B4001; HLA-B4002; HLA-B4402; HLA-B4403; HLA-B4601; HLA-B4801; HLA-B4901; HLA-B5001; HLA-B5101;
 HLA-B5201; HLA-B5301; HLA-B5501; HLA-B5601; HLA-B5701; HLA-B5801
 и HLA-B5802.

Композицию для восстановления можно использовать для восстановления одного типа пептидов (т.е. которые все включают по существу одинаковую или одинаковую аминокислотную последовательность) или для смесей разных пептидов, включающих разные аминокислотные последовательности. Фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 и вплоть до 33 разных пептидов. "Разные пептиды" в данном случае подразумеваются как включающие разные аминокислотные последовательности, предпочтительно имеющие меньше чем 60, 50, 40%, или предпочтительно меньше чем 30% идентичности последовательностей, как определено по их полной длине. Разные пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, могут представлять собой пептиды, включающие длину, определенную в настоящем изобретении выше, которые вместе перекрываются с полной аминокислотной последовательностью белкового антигена, из которого происходят эти пептиды. Однако, в некоторых случаях, иммунизация полным набором перекрывающихся (синтетических) длинных пептидов, охватывающих полноразмерные белковые антигены, недостижима, и необходимо сделать выбор. Для ограничения количества пептидов в вакцине, предпочтительно, чтобы были выбраны и включены наиболее иммуногенные длинные пептиды, которые распознаются наибольшим процентом пациентов.

По меньшей мере один из пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, может содержать по меньшей мере один цистеиновый остаток, способный к образованию межмолекулярной дисульфидной связи, или может содержать по меньшей мере два цистеиновых остатка, которые способны образовывать внутри- и межмолекулярные дисульфидные мостиковые связи. Предпочтительно, вакцинная композиция в соответствии с изобретением включает комбинацию пептидов, где указанная комбинация пептидов охватывает по меньшей мере 70, 80, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% HLA молекул I класса, которые кодируются HLA аллелями, преобладающими в популяции людей, которые являются пациентами, подлежащими лечению, как определено выше.

Количество пептидов, подлежащих восстановлению в композиции для восстановления по изобрете-

нию, предпочтительно представляет собой фармацевтическую единицу дозирования и/или количество для инъекции в одном объеме, как определено выше.

Высушенные пептиды могут представлять собой пептиды, свободные от других составляющих, но также могут включать буферные компоненты, такие как трифторуксусная кислота (TFA), соли, такие как натриевые, калиевые или фосфатные соли (например, NaCl, KCl и NaPO₄). Количество других составляющих предпочтительно меньше чем 30%, более предпочтительно меньше чем 25%, в расчете на общую массу сухих пептидов, подлежащих восстановлению. Высушенные пептиды, подлежащие восстановлению, могут быть в физически высушенном состоянии, что достигается при помощи способов, таких как, но не ограничивающихся этим, испарение на ротормном испарителе, лиофилизация (сушка замораживанием) и распылительная сушка.

Предпочтительные белковые антигены, из которых происходят пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, определены ниже.

HPV-происходящие пептиды

Пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, могут представлять собой пептиды (смеси пептидов), происходящие из ранних HPV антигенных белков E2, E6 или E7. Предпочтительно, непрерывная аминокислотная последовательность выбрана из полноразмерных аминокислотных последовательностей HPV E6 и E7 белков из серотипа HPV высокого онкогенного риска, таких как серотипы 16, 18, 31, 33 или 45, более предпочтительно из аминокислотных последовательностей HPV E6 и E7 серотипов 16, 18, 31 или 33, наиболее предпочтительно из серотипов 16 или 18, из которых 16 является наиболее предпочтительным. Аминокислотные последовательности белков HPV серотипа 16 E2 (UniProtKB P03120), E6 (UniProtKB - P03126) и E7 (UniProtKB - P03129) представлены в SEQ ID NO: 14-16 соответственно. Аминокислотные последовательности белков HPV серотипа 18 E2 (UniProtKB P06790), E6 (UniProtKB - P06463) и E7 (UniProtKB - P06788) представлены в SEQ ID NO: 17-19 соответственно.

Предпочтительные пептиды и пептидные смеси, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению и происходящие из HPV E6 и E7 белков, являются такими, которые определены в WO 00/75336 A2. Предпочтительными пептидами являются пептиды, включающие или состоящие из непрерывной последовательности в иммуногенной области, представленной любой из SEQ ID NO: 20-26.

Предпочтительно один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включают CTL эпитоп, выбранный из группы, представленной SEQ ID NO: 27-67.

Предпочтительные пептиды и пептидные смеси, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению и происходящие из HPV E2, E6 и E7 белков, являются такими, которые определены в WO 2002/070006 A2 и WO2002/090382, которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки. Предпочтительными пептидами являются пептиды, включающие или состоящие из непрерывной последовательности в следующих HPV иммуногенных областях E2 (31-120); E2 (151-195); E2 (271-365); E6 (81-158); E7 (31-77), предпочтительно HPV16 серотипа, и представлены как SEQ ID NO: 68-72 соответственно.

Предпочтительно один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включают Th эпитоп, который выбран из DR1/E2 351-365, DR2/E2 316-330, DR2/E2 346-355, DR4/E2 51-70, E2 61-76, DQ6/E2 311-325, DR15/E7 50-62, DR3/E7 43-77, DQ2/E7 35-50 и DR1/E6 127-142 (представлен как SEQ ID NO: 73-82 соответственно).

Предпочтительно пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включают по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, который распознается Т-клеткой, которая проникает в опухолевое поражение шейки матки, или Т-клеткой, которая присутствует в лимфатическом узле, или выделена из него, тазовой области, который дренирует из опухолевого поражения шейки матки. Предпочтительно Т-клеточный эпитоп присутствует или выделен из дренирующего лимфатического узла, включающего метастатические опухолевые клетки. Такие эпитопы раскрыты, например, в WO 2008/147187 A1, US 20060182762 A1, WO 2006013336 A1, WO 2009148230 A2, WO 2009148229 A2, WO 2002044384 A2, которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

В еще одном предпочтительном пептиде, подлежащем восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, непрерывная аминокислотная последовательность включает эпитоп, который выбран из группы, состоящей из непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 83-104, которые, как было подтверждено, представляют собой Т-клеточные эпитопы, которые распознаются Т-клетками, которые проникают в опухоль шейки матки, или Т-клеткой из дренирующего лимфатического узла.

Предпочтительный класса II CD4⁺ Th-клеточный эпитоп, содержащийся в пептиде, подлежащем восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, выбран из группы, состоящей из непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 83-99.

Предпочтительный класса I CD8⁺ CTL-клеточный эпитоп, содержащийся в пептиде, подлежащем восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, выбран из группы, состоящей из непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 85, 82, 100-104.

Предпочтительные пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включают или состоят из непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 1-13.

Предпочтительные смеси пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в вакцинную композицию по изобретению, представляют собой смеси пептидов, которые содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 пептидов, включающих или состоящих из последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1-5; по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 пептидов, включающих или состоящих из непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 1-6; и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 пептидов, включающих или состоящих из непрерывной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 7-13. Предпочтительно, фармацевтическая композиция включает смесь пептидов, включающих последовательность SEQ ID NO: 1-5 или SEQ ID NO: 1-6 или SEQ ID NO: 7-13. Предпочтительно, различные пептиды в смеси присутствуют в фармацевтической композиции в по существу равных пропорциях.

HBV-происходящие пептиды

Пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, могут представлять собой пептиды (смеси пептидов), происходящие из различных генотипов, например, из HBV-A белков, HBV полимеразы (UniProtKB - P03159), HBV корового белка (UniProtKB - P0C625), HBV X белкп и HBV большого поверхностного белка (UniProtKB - P03141), которые представлены последовательностями SEQ ID NO: 105-108. Предпочтительные пептиды, смеси пептидов и эпитопы, присутствующие в этих пептидах, раскрыты, например, в WO 2015/187009, WO 2014/102540 A1, WO 93/03753, WO 95/03777, US 2010/0068228 A1, US 2009/0311283 A1, которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

Предпочтительно, один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включают или состоят из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109-146.

Предпочтительно пептид, подлежащий восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включает или состоит из пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 134, 135, 138 и 142, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 135, 138 и 142, еще более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 134, 135 и 142, еще более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 135 и 142, еще более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 121, 129, 132, 133 и 142, наиболее предпочтительно выбранного из группы SEQ ID NO: 133, 142 и 121. Предпочтительно один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включает или состоит из пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 118, 121, 122, 126, 129, 132-135. Предпочтительно, один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включает или состоит из пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 129 и 133.

Предпочтительные смеси пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в вакцинную композицию по изобретению, представляют собой смеси по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 и вплоть до 33 разных пептидов из пептидов, состоящих из или включающих пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109-146, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 134, 135, 138 и 142, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 135, 138 и 142, еще более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 134, 135 и 142, еще более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 135 и 142, еще более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 118, 121, 122, 126, 129, 132, 133, 135 и 142, еще более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 121, 129, 132, 133 и 142, наиболее предпочтительно выбранный из группы SEQ ID NO: 133, 142 и 121. Более предпочтительной является композиция, которая включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 и вплоть до 33 разных пептидов из пептидов, состоящих из или включающих пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 118, 121, 122, 126, 129, 132-135, более предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 129 и 133. Другие предпочтительные смеси, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, представляют собой смесь, включающую пептид, который

включает или состоит из пептида SEQ ID NO: 121, в комбинации с пептидом, который включает или состоит из по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 139, 140, 133, 139, 142, 118, 129; и смесь, включающую пептид, который включает или состоит из пептида SEQ ID NO: 133, в комбинации с пептидом, который включает или состоит из по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 139, 140, 63, 139, 142, 118, 129. Предпочтительно, разные пептиды в смеси присутствуют в фармацевтической композиции в по существу равных пропорциях.

PRAME-происходящие пептиды

Пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, могут представлять собой пептиды (смеси пептидов), происходящие из PRAME (UniProtKB P78395), который представлен последовательностью SEQ ID NO: 147. Предпочтительные пептиды, смеси пептидов и эпитопы, присутствующие в этих пептидах, раскрыты, например, в WO 2008/118017 A2, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки. Предпочтительно, один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению, включают или состоят из пептида, выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 148-167. Предпочтительные смеси пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в вакцинную композицию по изобретению, представляют собой смеси по меньшей мере из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 разных пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 148-167.

Предпочтительно один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, включает Th эпитоп, который выбран из SEQ ID NO: 168-169.

P53-происходящие пептиды

Пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, могут представлять собой пептиды (смеси пептидов), происходящие из P53 (например, UniprotKB P04637), который представлен последовательностью SEQ ID NO: 190. Предпочтительные пептиды, смеси пептидов и эпитопы, присутствующие в этих пептидах, раскрыты, например, в WO 2008/147186 A2, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки. Предпочтительно, один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению, включают или состоят из пептида, выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 191-211, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 191-204.

Предпочтительные смеси пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в вакцинную композицию по изобретению, представляют собой смеси по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 разных пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 191-211.

PSMA-происходящие пептиды

Пептиды, подлежащие восстановлению и/или включению в фармацевтическую композицию по изобретению, могут представлять собой пептиды (смеси пептидов), происходящие из PSMA (например, UniprotKB Q04609), который представлен последовательностью SEQ ID NO: 212. Предпочтительные пептиды, смеси пептидов и эпитопы, присутствующие в этих пептидах, раскрыты, например, в WO 2013/006050 A1, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки. Предпочтительно, один или несколько пептидов, подлежащих восстановлению, включают или состоят из пептида, выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 213-232.

Предпочтительные смеси пептидов, подлежащих восстановлению и/или включению в вакцинную композицию по изобретению, представляют собой смеси по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 разных пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 213-232.

Также предпочтительные антигенные белки, пептиды, подлежащие восстановлению, и эпитопы в этих пептидах включают антигенные белки, пептиды и эпитопы, которые демонстрируют существенную идентичность любому из определенных антигенных белков, пептидов и эпитопов, определенных в настоящем изобретении. Идентичность последовательностей в настоящем изобретении определяется как взаимосвязь между двумя или более аминокислотными последовательностями (полипептида или белка), которую определяют путем сравнения последовательностей. В данной области техники "идентичность" также означает степень родства последовательностей между аминокислотными последовательностями, которая определяется соответствием между участками таких последовательностей. Идентичность последовательностей можно определить путем выравнивания двух пептидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания, в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности одинаковой длины предпочтительно выравнивают, используя алгоритмы глобального выравнивания (например, Needleman Wunsch), которые выравнивают последовательности оптимально по всей длине, тогда как последовательности по существу разной длины предпочтительно выравнивают, используя алгоритм локального выравнивания (например, Smith Waterman). Последовательности могут быть указаны как "по существу идентичные", когда они (при оптимальном выравнивании, например, программами GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют по меньшей мере определенный минимальный процент идентичности последовательностей (как определено ниже). GAP использует алгоритм глобального выравнивания Needleman и Wunsch для выравни-

нивания двух последовательностей по всей их длине (полной длины), максимизируя количество совпадений и минимизируя количество гэпов. Глобальное выравнивание подходящим образом используется для определения идентичности последовательностей, когда две последовательности имеют одинаковую длину. Обычно используются параметры GAP по умолчанию с штрафом за создание гэпа=50 (нуклеотиды)/8 (белки) и штрафом за расширение гэпов=3 (нуклеотиды)/2 (белки). Для белков по умолчанию используется матрица оценки Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивание последовательностей и баллы для процента идентичности последовательностей можно определить с использованием компьютерных программ, таких как GCG Wisconsin Package, версия 10.3, доступная от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-37 52 USA, или с использованием программы с открытыми исходными кодами, такой как программа "игла" (используя глобальный алгоритм Needleman Wunsch) или "вода" (используя локальный алгоритм Smith Waterman) в EmbossWIN версии 2.10.0, используя те же параметры, что и для GAP выше, или используя настройки по умолчанию (как для "иглы", так и для "воды") штраф по умолчанию за открытие гэпа равен 10,0, а штраф за расширение гэпа по умолчанию равен 0,5; по умолчанию матрицы подсчета представляют собой Blossum62 для белков). Когда последовательности имеют по существу разную общую длину, локальные выравнивания, такие как использующие алгоритм Smith Waterman, являются предпочтительными.

Альтернативно процент идентичности можно определить путем поиска в общедоступных базах данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д. Таким образом, последовательности белков по настоящему изобретению можно также использовать как "запрашиваемую последовательность" для осуществления поиска в общедоступных базах данных для, например, идентификации других членов семейства или соответствующих последовательностей. Такие поиски можно осуществить с использованием программ BLASTp и BLASTx (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Поиск белков при помощи программы BLAST можно осуществить с использованием программы BLASTx, оценка=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по изобретению. Для получения выравниваний с гэпами для сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTx и BLASTp). См. начальную страницу National Center for Biotechnology Information на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Антигенный белок, пептид или эпитоп, который демонстрирует по существу идентичность соответствующему антигенному белку, пептиду или эпитопу, определенному в настоящем изобретении, следует понимать как имеющий идентичность по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% любой из конкретных последовательностей, указанных в настоящем изобретении, на основании полной длины указанной конкретной последовательности (т.е. по всей ее длине или в целом).

Медицинское применение

Обеспечивается способ профилактики или лечения персистентной или хронической инфекции, предракового расстройства и/или рака. Другими словами, обеспечивается фармацевтическая композиция по изобретению, как определено выше, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для профилактики или лечения персистентной или хронической инфекции, предракового расстройства и/или рака. Такой способ или применение включает стадию введения фармацевтической композиции по изобретению пациенту, который нуждается в такой профилактике и/или лечении. Пациент, нуждающийся в профилактике и/или лечении, также может быть указан как пациент и может относиться к животному, такому как млекопитающее, включая, но не ограничиваясь этим, человека или млекопитающее, не являющееся человеком, такое как отличный от человека примат, корова, лошадь, собака, овца или кошка.

Предпочтительно обеспечивается фармацевтическая единица дозирования, как определено выше. Как также указано выше, эту фармацевтическую единицу дозирования можно вводить сразу в виде одной инъекции или в виде нескольких объемов, вводимых в разных местах. Например, фармацевтическую единицу дозирования можно разделить на две инъекции, каждую из которых вводят в одну из двух ног или рук пациента, подлежащего лечению. Две инъекции могут включать одинаковые или разные пептидные смеси. Например, первая инъекция может включать SEQ ID NO: 1-5 или SEQ ID NO: 1-6, а вторая инъекция может включать SEQ ID NO: 7-13, причем обе инъекции вводят в один и тот же или по существу в один и тот же момент времени, где по существу один и тот же момент времени следует понимать как в пределах не более 15 мин, предпочтительно не более 2 мин.

Введение одной или нескольких инъекций можно осуществлять один раз или, альтернативно, можно затем повторить, например, но не ограничиваясь этим, ежедневно, раз в две недели, еженедельно, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, ежемесячно, раз в 2 месяца, раз в 3 месяца, раз в 4 месяца, раз в 5 месяцев, раз в 6 месяцев, раз в 7 месяцев, раз в 8 месяцев, раз в год, один раз в 2 года, один раз в 5 лет или один раз в 10 лет.

Предпочтительно фармацевтическую композицию вводят в эффективном количестве, как определено выше. Предпочтительно фармацевтическая композиция по изобретению предназначена для внутривенного или подкожного или внутримышечного введения, хотя могут быть предусмотрены другие пути

введения, такие как введение через слизистую оболочку или интрадермальное и/или внутрикожное введение или интратуморальное введение, например, путем инъекции. Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить однократно. Альтернативно введение может быть повторено, если необходимо, и/или отдельные пептиды или пептидные смеси или композицию, включающую разные пептиды или пептидные смеси, можно последовательно вводить, при этом "последовательно" может относиться к времени и/или месту.

Предпочтительно фармацевтическая композиция представляет собой вакцинную композицию для индукции Т-клеточного ответа против по меньшей мере одного эпитопа, содержащегося в пептиде. Предпочтительно, вакцина предназначена для профилактики, частичного устранения и/или лечения или полного устранения антиген-ассоциированного заболевания или состояния у пациента, например персистентной инфекции, ракового (новообразование) или предракового расстройства, предпочтительно как можно определить по

активации или индукции иммунной системы и/или повышению уровня антиген-специфических активированных $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток в периферической крови или в тканях, как определяется Elispot анализом или по тетрамерному окрашиванию $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клеток или повышению уровня цитокинов, продуцируемых этими Т-клетками, определяемого внутриклеточным окрашиванием цитокинов $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в проточной цитометрии после по меньшей мере одной недели лечения; и/или

ингибированию пролиферации антиген-связанной инфекции или определяемому уменьшению антиген-экспрессирующих клеток или снижению клеточной жизнеспособности антиген-экспрессирующих клеток; и/или

индукции или повышенной индукции клеточной гибели антиген-экспрессирующих клеток; и/или ингибированию или предотвращению увеличения антиген-экспрессирующих клеток.

Примеры раковых заболеваний, которые можно предотвратить и/или лечить при помощи способа по изобретению, включают, без ограничения, цервикальную интраэпителиальную неоплазию (CIN), интраэпителиальную неоплазию вульвы (VIN), вагинальную интраэпителиальную неоплазию (VaIN), анальную интраэпителиальную неоплазию (AIN) и интраэпителиальную неоплазию полового члена (PIN), а также рак шейки матки, вульвы, влагалища, анального отверстия, полового члена, дыхательно-пищеварительного тракта и головы и шеи; рак печени, лейкоз (например, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому (например, болезнь Ходжкина, неходжкинская болезнь), макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, сквамозно-клеточная карцинома карцинома, базально-клеточная карцинома, аденокарцинома, рак потовой железы, рак сальной железы, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак матки, тестикулярный рак, карцинома легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, карцинома мочевого пузыря, множественная миелома, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитома, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, неврома слухового нерва, олигодендроглиома, шваннома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома).

Способ по изобретению может быть частью комбинированной терапии, которая может обеспечиваться как отдельное лечение или может быть добавлена к фармацевтической композиции по изобретению. Способ по изобретению можно комбинировать с блокаторами контроля контрольных точек, моноклональными антителами (mAb), нацеленными на выбранные члены семейства рецепторов TNF (например, CD40, 4-1 BB/CD137, OX-40/CD134 и CD27), иммуносупрессорными цитокинами (например, IL-10, TGF- β и IL-6) и/или γ С цитокинами (например, IL-7, IL-15 и IL-21 или IL-2), ингибиторами IDO (индолламин 2,3-диоксигеназы), талидомидом и/или его производными, другими иммуномодуляторами (например, соединениями, которые, как известно, истощают иммунодепрессивные Tregs и/или MDSCs), стандартным лечением, например химиотерапией, лучевой терапией, хирургией, IFN- α кондиционированием, противовирусной терапией, антибактериальной терапией, УФ терапией, противовоспалительной терапией и т.д. В случае лечения или профилактики предракового расстройства или рака, пептидную вакцину можно комбинировать с лучевой терапией и/или химиотерапией, такой как лечение карбоплатином, паклитакселом, карботаксолом (комбинация карбоплатина, паклитаксела) и/или цисплатином. Например, способ по изобретению может быть частью химиотерапевтического режима, где химиотерапию применяют один раз каждые три недели. Предпочтительно первую фармацевтическую единицу дозирования фармацевтической композиции по изобретению вводят через 2 недели после

второго или третьего цикла химиотерапии.

Способ восстановления

Также обеспечивается способ для восстановления высушенных, предпочтительно лиофилизированных, пептидов, включающий следующие последовательные стадии:

- а) обеспечение сосуда, включающего высушенные, предпочтительно лиофилизированные, пептиды;
- б) оттаивание пептидов, предпочтительно в течение приблизительно 5-30 мин;
- с) добавление композиции для восстановления по изобретению в сосуд, включающий пептиды, предпочтительно взбалтывания сосуда;
- д) дать перемешаться, предпочтительно в течение приблизительно 0,5-5 мин; и
- е) взбалтывание сосуда до получения прозрачного раствора, предпочтительно в течение приблизительно 1-3 мин.

Предпочтительно стадии б)-е) осуществляют при комнатной температуре.

Также обеспечивается способ получения фармацевтической композиции, включающий следующие последовательные стадии:

- (i) забрать восстановленные пептиды, получаемые способом для восстановления высушенных пептидов, определенным выше, в первый шприц;
- (ii) соединить первый шприц стадии (i) с вторым шприцем, включающим масляный адъювант, с использованием соединителя;
- (iii) вытеснить содержимое первого шприца во второй шприц и обратно
- (iv) повторить стадию (iii) примерно 10-50 раз в общей сложности за приблизительно 10-50 с.

Предпочтительно, стадии (i)-(iv) осуществляют при комнатной температуре.

Прозрачный раствор, полученный на стадии е) в способе для восстановления высушенных пептидов, следует понимать как восстанавливающую композицию, включающую восстановленные пептиды, которую можно использовать как исходный материал, т.е. как "восстановленные пептиды" на стадии (i) способа получения фармацевтической композиции.

Предпочтительно, высушенные, предпочтительно лиофилизированные, пептиды в сосуде и используемые в качестве исходного материала на стадии а) в способе восстановления высушенных пептидов, представляют собой пептиды, определенные выше как пептиды, подлежащие восстановлению и/или пептиды, подлежащие включению в фармацевтическую композицию по изобретению. Предпочтительно, указанный сосуд содержит пептиды в количестве для инъекции в виде разового объема в способе профилактики и/или лечения, предпочтительно в способе лечения и/или профилактики, как определено в настоящем изобретении, т.е. одну фармацевтическую единицу дозирования или ее часть в случае нескольких инъекций в разных местах тела пациента по существу в один и тот же момент времени. Альтернативно, количество высушенных пептидов во сосуде на стадии а) превышает количество для инъекции в виде разового объема в указанном способе. Например, количество пептидов в сосуде может быть вдвое больше, чем количество для инъекции в виде разового объема. В последнем случае половину восстановленного объема можно смешать с количеством масляного адъюванта в способе получения фармацевтической композиции, такой как фармацевтическая композиция по изобретению, чтобы в итоге получить разовый объем фармацевтической композиции для инъекций в способе или лечения или профилактики, или, альтернативно, общее количество восстановленного объема можно смешать с количеством масляного адъюванта, чтобы в итоге получить два объема фармацевтической композиции для инъекции.

Предпочтительно пептиды на стадии б) способа восстановления пептидов, оттаивают при комнатной температуре в течение приблизительно 5-30 мин или 10-30 мин, например, в течение 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мин, или любого периода времени в пределах указанных значений.

Предпочтительно чтобы смешивание на стадии д) способа восстановления пептидов происходило без по существу взбалтывания или перемешивания сосуда, предпочтительно в течение примерно 0,5-2 мин при комнатной температуре, например в течение 0,5, 1, 1,5 или 2 мин. Другими словами, предпочтительно, когда пептиды на стадии д) оставляют смешиваться с восстанавливающей композицией в спокойном состоянии.

Взбалтывание на стадии е) способа восстановления пептидов осуществляют путем взбалтывания до тех пор, пока не будет получен прозрачный раствор. Как указано, это осуществляют предпочтительно в течение приблизительно 1-3 мин. Однако для некоторых пептидов требуется более длительное или более короткое время взбалтывания. Однако прозрачный раствор предпочтительно должен быть получен в течение 20 мин. Следовательно, взбалтывание можно осуществлять в пределах от 1 до 20 мин, от 1 до 10 мин, от 1 до 5 мин или от 1 до 3 мин, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 мин, любого периода времени в пределах указанных значений, предпочтительно до тех пор, пока не будет получен прозрачный раствор при визуальном осмотре.

Композиция для восстановления стадии с) способа восстановления пептидов и масляный адъювант стадии (ii) способа получения фармацевтической композиции, являются такими, которые определены выше. Предпочтительно, количество восстанавливающей композиции на стадии с) находится в пределах от приблизительно 0,5 до 2 мл, предпочтительно 1 мл. Предпочтительно, количество восстановленных пептидов на стадии (i) представляет собой общее количество восстановленных пептидов, полученное

после стадии е), т.е. в прозрачном растворе, полученном после стадии е). Однако необязательно используют меньше, как показано выше. Предпочтительно объем этой восстанавливающей композиции смешивают с масляным адьювантом на стадии (ii)-(iv) в соотношении от приблизительно 2:1 до приблизительно 1:2, таком как 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,9, 1:1,8, 1:1,7, 1:1,6, 1:1,5, 1:1,4, 1:1,3, 1:1,2 или 1:1,1, предпочтительно 1:1 восстанавливающая композиция:масляный адьювант.

Соединитель на стадии (ii) может представлять собой любой соединитель, подходящий для соединения двух шприцев, что делает возможным обмен жидкостями между двумя шприцами, такой как, но не ограничивающийся этим, Т и I соединители. Повторение стадии (iv) можно осуществлять примерно 10-50 раз, например, но не ограничиваясь этим, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 50 раз, или любое число раз в пределах указанных значений.

Набор из частей

Кроме того, обеспечивается состоящий из частей набор, включающий

- 1) первый сосуд, содержащий высушенные, предпочтительно лиофилизированные пептиды, где предпочтительно пептиды представляют собой пептиды, определенные выше;
- 2) второй сосуд, содержащий восстанавливающую композицию по изобретению; и необязательно
- 3) третий сосуд, содержащий масляный адьювант, предпочтительно определенный выше.

Предпочтительно все компоненты, т.е. высушенные пептиды, восстанавливающая композиция и масляный адьювант являются стерильными и/или подходящими для фармацевтического или клинического использования. Предпочтительно, эти компоненты получают с использованием надлежащей производственной практики (GMP), и они имеют GMP качество, определенное как European Medicines Agency, так и Food and Drug Administration.

Предпочтительно первый сосуд хранят при температуре, при которой восстанавливающая композиция стабильна в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев или 1 года или даже 2 лет. Предпочтительно, указанная температура составляет от -25 до 25°C, или от -23 до -18°C, или от 0 до 10°C, или от 2 до 8°C, или от 18 до 23°C. Предпочтительно второй сосуд хранят при температуре, при которой восстанавливающая композиция стабильна в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев или 1 года или даже 2 лет. Предпочтительно, указанная температура составляет от -25 до 25°C, или от -23 до -18°C, или от 0 до 10°C, или от 2 до 8°C, или от 18 до 23°C. Предпочтительно третий сосуд хранят при температуре, при которой восстанавливающая композиция стабильна в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев или 1 года или даже 2 лет. Предпочтительно указанная температура составляет от -25 до 25°C, или от -23 до -18°C, или от 0 до 10°C, или от 2 до 8°C, или от 18 до 23°C. Предпочтительно первый, второй и третий сосуд хранят при одной и той же температуре.

Необязательно указанный набор из частей дополнительно включает руководство, описывающее способ восстановления высушенных пептидов, как определено выше, условия хранения, способ приготовления фармацевтической композиции, как определено выше, и/или руководство по хранению первого, второго и/или третьего сосуда. Кроме того, набор может включать руководство по введению фармацевтической композиции, которая должна быть приготовлена. Предпочтительно объем первого, второго и/или третьего сосуда составляет не более 50 мл, предпочтительно от 0,1 до 10 мл, предпочтительно от 1 до 10 мл, например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 мл или любой промежуточный объем. Под сосудом следует понимать контейнер, который может иметь любую форму. Необязательно, сосуд следует понимать здесь как шприц. Необязательно, первый сосуд может быть присоединен через соединитель вручную ко второму сосуду, чтобы позволить восстанавливающей композиции контактировать и растворять пептиды. Необязательно, второй сосуд может впоследствии быть присоединен к третьему сосуду, чтобы позволить восстанавливающей композиции, содержащей пептиды, смешиваться с масляным адьювантом. Необязательно, набор дополнительно включает один или несколько соединителей, таких как Т-соединитель, и/или устройство для инъекций, такое как игла. Предпочтительно количество пептидов в первом сосуде, количество композиции для восстановления во втором сосуде и/или количество масляного адьюванта в третьем сосуде являются такими, как определено в способе восстановления пептидов и/или способе получения фармацевтической композиции, определенных выше.

В данном документе и в формуле изобретения глагол "содержать" и формы его спряжения используются в их неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, конкретно не указанные, не исключены. Кроме того, ссылка на элемент посредством неопределенного артикля "а" или "an" не исключает возможности того, что присутствует более одного элемента, если контекст явно не требует наличия одного и только одного из элементов. Таким образом, неопределенный артикль "а" или "an" обычно означает "по меньшей мере один".

Слово "приблизительно" или "приблизительно" при использовании в сочетании с числовым значением (например, приблизительно 10) предпочтительно означает, что значение может представлять собой данное значение (10) более или менее 0,1% от значения.

Информацию о последовательности, представленную в настоящем изобретении, не следует понимать так узко, как требующую включения ошибочно идентифицированных оснований. Специалист в данной области способен идентифицировать такие ошибочно идентифицированные основания и знает, как исправить такие ошибки.

Все патенты и литература, цитируемые в настоящем описании, включены в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте.

Описание чертежей

Фиг. 1 - ВЭЖХ хроматограммы композиции DP-6P (включающей SLP, представленные SEQ ID NO: 1-6) в трех разных смесях растворителей, полученные через 2 ч после растворения и хранения при комнатной температуре. А) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL; В) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в 20% об./об. DMSO/вода; С) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в 20% об./об. DMSO/вода с 10 мМ DTT.

Фиг. 2 - ВЭЖХ хроматограммы DP-6P (включающей SLP, представленные SEQ ID NO: 1-6) в двух разных смесях растворителей и в двух точках времени после растворения ($t=0$ и $t=24$). Обе смеси растворителей содержат пропиленгликоль, Этанол, воду и стабилизаторы и восстановители. А) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси 600 мкл воды, 267 мкл пропиленгликоля, 133 мкл этанола и 1 мг/мл аскорбиновой кислоты при $t=0$ В) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси 600 мкл WFI, 267 мкл пропиленгликоля, 133 мкл этанола и 1 мг/мл аскорбиновой кислоты при $t=24$; С) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL при $t=0$; D) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL при $t=24$.

Фиг. 3 - ВЭЖХ хроматограммы DP-6P (включающей SLP, представленные SEQ ID NO: 1-6) в двух разных смесях растворителей. Все смеси растворителей содержат, на мл, 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и либо Tween20, либо Cremophor EL (62,5 мкл). А) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси растворителей, включающей Tween20 при $t=0$; В) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси растворителей, включающей Tween20 при $t=2$ h; С) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси растворителей, включающей Cremophor EL при $t=0$; D) DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси растворителей, включающей Cremophor EL при $t=24$.

Фиг. 4 - ВЭЖХ хроматограммы DP-6P (включающей SLP, представленные SEQ ID NO: 1-6) и DP-7P (включающей SLP, представленные SEQ ID NO: 7-13) после восстановления и эмульгирования с Montanide ISA 51 VG. Смесь растворителей для восстановления содержит, на мл, 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и Cremophor EL (62,5 мкл). Перед анализом пептиды экстрагировали из эмульсии путем добавления избыточного количества смеси растворителей и вызывая фазовое разделение путем центрифугирования. А) DP-6P (общее количество пептидов 2,4 мг), растворенная в 1 мл смеси растворителей, включающей Cremophor EL, при $t=0$ (сразу после получения вакцины и экстракции); В) DP-6P (общее количество пептидов 2,4 мг), растворенная в 1 мл смеси растворителей, включающей Cremophor EL, при $t=24$ (после 2 ч хранения вакцинного продукта, с последующей экстракцией). С) DP-7P (общее количество пептидов 2,8 мг), растворенная в 1 мл смеси растворителей, включающей Cremophor EL, при $t=0$ (сразу после получения вакцины и экстракции); D) DP-7P (общее количество пептидов 2,8 мг), растворенная в 1 мл смеси растворителей, включающей Cremophor EL, при $t=24$ (после 2 ч хранения вакцинного продукта, с последующей экстракцией).

Фиг. 5 - сравнение распределения частиц по размерам (наложение) между DP-6P эмульсиями с использованием двух разных концентраций лимонной кислоты. DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг), растворенная в смеси 750 мкл 0,05М или 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL и затем эмульгированный с 1 мл Montanide ISA51 VG.

Фиг. 6 - сравнение распределения частиц по размерам (наложение) между DP-6P эмульсиями (включающими SLP, представленные SEQ ID NOs: 1-6). DP-6P (общее количество пептидов 2,40 мг) растворяли в смеси 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL и затем эмульгировали с 1 мл Montanide ISA51 VG. А) Три независимых (повторных) получения (prep1, prep2 и prep3) при $t=0$, указывающие на устойчивость способа эмульгирования; В) два независимых (повторных) получения при $t=0$ (prep1t04 и prep1t24) и $t=24$ (prep2t04 и prep2t24), демонстрирующих как устойчивость способа эмульгирования, так и физическую стабильность при использовании эмульсии в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре.

Фиг. 7 - сроки и последовательность выполнения эксперимента для TC-1 опухоли.

Фиг. 8 - разрастание TC-1 опухолей у мышей, вакцинированных либо А) 40% об./об. DMSO/WFI, эмульгированным 1:1 с Montanide только (DMSO), В) восстанавливающей (Rec.) композицией (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL), эмульгированной 1:1 с Montanide только (Rec. композиция), либо С) SLP, представленным SEQ ID NO: 6, и CpG ODN1826, растворенными в 40% об./об. DMSO/WFI, эмульгированными 1:1 с Montanide (DMSO+SLP), либо D) SLP, представленным SEQ ID NO: 6, и CpG ODN1826, растворенными в восстанавливающей (Rec.) композиции (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL), эмульгированными с 1:1 Montanide (Rec. композиция+SLP).

Фиг. 9 - график Каплана-Мейера (выживаемости) А) и процент индуцированных D^b-RAYNIVTF

(тетрамер) положительных CD8⁺ Т-клеток В) группы 1 мышей, у которых индуцировали TC-1 опухоли и затем вакцинировали 40% об./об. DMSO/WFI, эмульгированным 1:1 с Montanide только (DMSO), группы 2 мышей, у которых индуцировали TC-1 опухоли и затем вакцинировали восстанавливающей композицией (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL), эмульгированной 1:1 с Montanide только (Rec. композиция), группы 3 мышей, у которых индуцировали TC-1 опухоли и затем вакцинировали SLP, представленным SEQ ID NO: 6, и CpG ODN1826, растворенными в 40% об./об. DMSO/WFI, эмульгированными 1:1 с Montanide (DMSO+SLP), и группы 4 мышей, у которых индуцировали TC-1 опухоли и затем вакцинировали SLP, представленным SEQ ID NO: 6, и CpG ODN1826, растворенными в восстанавливающей композиции (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL), эмульгированными 1:1 с Montanide (Rec. композиция+SLP). Звездочка означает значимую разницу (критерий Стьюдента для одной выборки, $p=0,022$); ns означает незначимую разницу ($p=0,21$).

Фиг. 10 - ВЭЖХ хроматограммы P53 DP-5P (включающей SLP, представленные SEQ ID NO: 191, 193, 194, 201 и 203). P53 DP-5P восстанавливали смесью растворителей, содержащей, на мл, 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и Cremophor EL (62,5 мкл). Перед анализом пептиды экстрагировали из эмульсии конечного продукта путем добавления избыточного количества смеси растворителей и вызывая фазовое разделение путем центрифугирования. А) P53 DP-5P (общее количество пептидов 2,0 мг), растворенная в 1 мл смеси растворителей, включающей Cremophor EL, при $t=0$ (сразу после получения вакцины и экстракции); В) P53 DP-5P (общее количество пептидов 2,0 мг), растворенная в 1 мл смеси растворителей, включающей Cremophor EL, при $t=24$ (после 2 ч хранения вакцинного продукта, с последующей экстракцией).

Примеры

Пример 1.

Введение.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы найти подходящий способ восстановления для мультипептидного HPV вакцинного продукта, включающий растворение пептидных лекарственных препаратов HPV-DP-6P и HPV-DP-7P с последующим эмульгированием с Montanide ISA51VG. Предыдущие исследования показали, что в DMSO/WFI композициях пептиды, содержащие один или несколько цистеиновых остатков, имеют сильную тенденцию к образованию дисульфидов. Для улучшения химической стабильности лекарственных продуктов и предотвращения образования дисульфидов в пептидах был разработан новый раствор без DMSO для восстановления обоих лекарственных препаратов. Этот новый раствор для восстановления должен обладать способностью растворять лекарственный продукт и приводить к стабильной эмульсии с Montanide ISA51VG. Образование дисульфидов должно быть минимальным.

Исследование состоит из четырех уровней анализа.

1. Скрининг для определения подходящей комбинации растворителей для восстановления лекарственных продуктов, контроль растворения пептидов путем визуального наблюдения.
2. Контроль стабильности эмульсии лекарственного продукта с Montanide. Стабильность оценивают путем визуального наблюдения и с использованием анализа размера частиц капель эмульсии.
3. Анализ химической стабильности лекарственного продукта после восстановления в растворителях, которые были эффективны на уровне 1 и 2.
4. Анализ химической стабильности лекарственного продукта после восстановления и эмульгирования с использованием растворителей, которые были эффективны на уровне 1, 2 и 3. Для этого пептиды растворяют, эмульгируют с Montanide ISA 51 VG, с последующей экстракцией из эмульсии и анализом пептидной композиции.

Материалы.

Использовали следующие лиофилизированные пептидные композиции: DP-5P, включающая пептиды, представленные SEQ ID NO: 1-5, смешанные при равной чистой массе 0,40 мг каждого пептида на сосуд (общее количество белка на сосуд 2,00 мг), и 0,56 мг TFA на сосуд; DP-6P, включающая пептиды, представленные SEQ ID NO: 1-6, смешанные при равной чистой массе 0,40 мг каждого пептида на сосуд (общее количество белка на сосуд 2,40 мг), и 0,67 мг TFA на сосуд; и DP-7P, включающая пептиды, представленные SEQ ID NO: 7-13, смешанные при равной чистой массе 0,40 мг каждого пептида на сосуд (общее количество белка на сосуд 2,80 мг), и 0,96 мг TFA на сосуд.

Использовали следующие химические продукты: Cremophor EL, (Sigma Aldrich, Kolliphor EL, C5135); Пропиленгликоль или PG ($\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich, W294004) Этанол или EtOH (абсолютный, VWR Emprove® Ph Eur, BP, USP. Article# 1.00986.1000); Лимонная кислота или CA ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich C1909); MilliQ вода (от EQP-063); стерильный Montanide ISA 51VG (SEPPIC, партия#14V011).

Использовали следующее оборудование: шприцевые экструзионные устройства (Discofix-3 Т-соединитель, B. Braun); DMSO-стойкие шприцы (NORM-JECT 2-мл с люэровским замком, Henke Sass Wolf); ВЭЖХ/МС система Waters; Malvern Mastersizer 2000; проточная ячейка Protein Simple MFI 5200.

Способы.

Растворение.

Восстанавливающую композицию получали путем смешивания органических и водных растворителей перед их добавлением к лиофилизированному лекарственному продукту. 1 мл различных восстанавливающих композиций добавляли к лекарственному продукту и смеси давали выстояться в течение 5 мин, при этом встряхивая раствор несколько раз. Физическую стабильность оценивали путем визуального наблюдения. Химическую стабильность оценивали с использованием ВЭЖХ/МС (см. ниже в разделе Химическая стабильность раствора лекарственного продукта).

Эмульгирование с Montanide.

Комбинации растворителей, приводящие к визуально прозрачному раствору лекарственного продукта, использовали в экспериментах эмульгирования с Montanide ISA51 VG. Если не указано иное, восстановление и эмульгирование осуществляли в соответствии с протприблизительном, представленным в табл. 1. Где указано, смешивание содержимого шприца А и В осуществляли по-разному. Эти адаптации процедуры в табл. 3 указаны в разделе "результаты" в табл. 4 и 5.

Таблица 1

Восстановление и эмульгирование лекарственного продукта (DP)

Стадия	Описание
1	По меньшей мере 10 минут и максимум 30 минут до начала формулирования оттаивать при комнатной температуре 1 сосуд с DP, лиофилизированным порошком для инъекции. Зарегистрировать время извлечения из морозильника (ч;мин) .
2	Забрать 1 мл восстанавливающей композиции в 2-мл шприц.
3	Зарегистрировать время начала восстановления (ч;мин) .
4	Добавить содержимое шприца, содержащего стерильную восстанавливающую композицию (1 мл) в DP сосуд. Не встряхивать сосуд. Извлечь шприц из сосуда.

5	Дать смеси выстояться в течение 2 минут при комнатной температуре, с последующей осторожным взбалтыванием в течение 3 минут.
	Если содержимое сосуда не полностью растворилось, перемешивать с завихрением в течение 30 секунд.
6	Забрать содержимое сосуда (1,0 мл) в новый шприц (шприц А).
7	Забрать 1,0 мл Montanide ISA 51 VG в третий 2-мл шприц (шприц В).
8	Снять один из белых колпачков Т-соединителя и плотно соединить шприц, содержащий пептид раствор в восстанавливающей композиции (1,0 мл), с соединителем (Шприц А).
9	Снять второй белый колпачок Т-соединителя и соединить шприц, содержащий 1,0 мл Montanide ISA 51 (Шприц В), с соединителем.
10	Повернуть ключ переключателя и выдавить содержимое шприца А сначала медленно в шприц В и затем из шприца В в шприц А. Это 1 цикл. Включить секундомер. Повторить цикл в общей сложности 50 раз 40-50 секунд. Записать количество секунд (регистрацию осуществляет второй оператор).
11	Забрать вакцинную эмульсию в один шприц. Отсоединить шприц от Т-соединителя и вставить новую иглу в шприц.

Методы лазерной дифракции для испытания стабильности эмульсии.

Стабильность эмульсии контролировали путем визуального наблюдения, а также с использованием анализа распределения частиц по размерам с использованием Malvern Mastersizer 2000.

Для анализа размера частиц осуществляли разбавление эмульсии либо водой, либо раствором 0,01М лимонной кислоты в воде для получения желаемого уровня затенения. Montanide смешивали с восстанавливающей композицией, включающей восстановленные DP, с использованием мешалки при скорости 1750 об/мин и применяли индекс рефракции 1,46. Распределение частиц по размерам выражали в D(0,5) и D(0,9) для распределения по объему.

Визуализация микропотока (MFI) для испытания стабильности эмульсии.

В качестве второго метода для анализа размера частиц для оценки стабильности эмульсии использовали визуализацию микропотока. Перед анализом осуществляли разбавление эмульсии путем добавления одной капли эмульсии к 10 мл 0,01М водного раствора лимонной кислоты и смешивания до гомогенности, с последующим 1:100 разбавлением этого раствора в воде. Образцы измеряли в вытесняемом объеме 0,20 мл в течение 0,68 мин или на 1 млн частиц в одном единственном анализе. Результаты выражены как Эквивалентный диаметр круга (ECD).

Химическая стабильность раствора лекарственного продукта.

Для образцов, показывающих полное растворение и стабильность эмульсии >2 ч, химическую стабильность растворов лекарственного продукта (без дополнительного разбавления) контролировали при помощи ВЭЖХ/МС на Waters Acquity ВЭЖХ системе, соединенной с Waters TQD масс-спектрометром с использованием колонки Waters Acquity (тип: BEH130, C18, 1,7 мкм, 2,1×150 мм). Обработку данных осуществляли с использованием программы Masslynx 4.1. УФ-детекцию осуществляли при 220 нм, и подвижная фаза представляла собой 0,05% TFA и 1% ACN в воде (буфер А) и 0,05% TFA в ACN (буфер В) при скорости потока 0,3 мл/мин. Температура колонки была 65°C, и температура автоматического дозатора была 5°C. Использовали объем вводимой пробы 5 мкл, и применяли профиль градиента табл. 2.

УФ-детекцию осуществляли по всей длине градиента, и масс-спектрометрический анализ осуществляли в течение 2-30 мин в положительном режиме.

Для анализа химической стабильности растворов лекарственных продуктов образцы анализировали

в различных точках времени, по меньшей мере вплоть до 2 ч после растворения.

Таблица 2

Профиль градиента для ВЭЖХ/МС

Время (мин)	Элюент А (%)	Элюент В (%)
0	87	13
0,5	87	13
5,5	79,5	20,5
17,0	68	32
22,8	45	55
28,5	45	55
28,6	20	80
30,0	20	80
30,1	87	13
33,0	87	13

Химическая стабильность эмульсий HPV-DP-6P и HPV-DP-7P вакцин при использовании.

Для образцов, показывающих полное растворение, стабильность эмульсии >2 ч и химическую стабильность растворов лекарственного продукта (без дополнительного разбавления) >2 ч, химическую стабильность эмульсий вакцин с Montanide ISA 51 VG при использовании контролировали методом ВЭЖХ/МС. Для анализа химической стабильности восстановленных и эмульгированных лекарственных продуктов образцы анализировали в различных точках времени, по меньшей мере вплоть до 2 ч после растворения. ВЭЖХ/МС анализ осуществляли в соответствии со способом, описанным выше для анализа химической стабильности раствора лекарственного продукта, с использованием дополнительной стадии подготовки образца для экстракции пептидов из вакцинной эмульсии.

Для подготовки образцов эмульгированных продуктов использовали следующие стадии.

Взять 300 мкл восстанавливающего раствора и добавить его в 15 мл пробирку Грейнера.

Добавить 100 мкл гептана.

Добавить 200 мкл эмульсии лекарственного продукта.

Забрать в пипетку и выпустить снова раствор три раза.

Перемешивать смесь вихревым способом в течение 30 с.

Центрифугировать смесь в течение 5 мин при 4400 об/мин для получения двухфазной системы.

С использованием 20-200-мкл пипетки отобрать 100 мкл образца из нижнего слоя и перенести в общий ВЭЖХ сосуд.

Анализировать методом ВЭЖХ/УФ/МС в соответствии со способом, описанным для анализа химической стабильности растворов лекарственного продукта.

Результаты.

Скрининг растворителей для восстановления и эмульгирования.

Растворители скринировали для определения восстанавливающей композиции, включающей как водную, так и органическую фракцию, которая является подходящей для восстановления лиофилизированных пептидов и образования химически и физически стабильной эмульсии с Montanide. Все эксперименты, описанные ниже, осуществляли с DP-6P. Эксперименты подтверждали с использованием DP-5P и DP-7P, но поскольку данные были в высокой степени сопоставимы, показаны только данные для DP-6P. Физическую стабильность восстановленных белков и эмульсии в этом скрининге оценивали путем визуального наблюдения.

В качестве органической фракции испытывали большое количество различных органических растворителей. Единственным органическим растворителем, способным полностью растворять DP-6P при смешивании с WFI (вода для инъекций) был NMP (табл. 3). Однако никакой стабильной эмульсии с Montanide не могли получить с использованием NMP/WFI в качестве восстанавливающей композиции. Использование физиологического раствора вместо WFI слегка улучшало стабильность эмульсии, но так и смогли получить эмульсии со стабильностью >2ч воспроизводимым образом.

Таблица 3

Скрининг растворителей на растворение DP-6P

Водные	Органические 1	Растворимость пептидов	Стабильность эмульсии
600 мкл WFI	400 мкл Глицерин	Частицы	NA
600 мкл WFI	400 мкл PG	Прозрачный вязкий раствор	NA
600 мкл WFI	400 мкл EtOH	Частицы	NA
WFI	100-20% DMF	Частицы	NA
800 мкл WFI	200 мкл NMP	Прозрачный раствор	гомогенная < 1ч
800 мкл WFI, 0,9% NaCl	200 мкл NMP	Прозрачный раствор	гомогенная < 2ч

Смеси органических растворителей в восстановлении.

Не был найден ни один отдельный органический растворитель, который в комбинации с WFI приводил бы к полному растворению DP-6P. Поэтому комбинации пропиленгликоля и других растворителей скринировали в качестве органической фракции в восстанавливающей композиции. Физическую стабильность оценивали путем визуального наблюдения. Химическую стабильность оценивали с использованием ВЭЖХ/МС.

Хотя все еще не наблюдали полного растворения DP-6P, наиболее приемлемой комбинацией растворителей, идентифицированной для растворения DP-6P, была смесь этанола, пропиленгликоля и Cremophor EL в качестве эмульгатора с WFI (фиг. 1).

Для дальнейшего улучшения процесса растворения при ограничении образования дисульфидов оценивали эффект добавления некоторых антиоксидантов и восстановителей к смеси растворителей (смесь этанола, пропиленгликоля, Cremophor EL и WFI) и оценивали пептидный раствор. Химическую стабильность анализировали при помощи ВЭЖХ/МС для контроля степени образования дисульфидов. Добавление DTT (35 молярных эквивалентов по сравнению с пептидом) или аскорбиновой кислоты (0,1-1% раствор в WFI) не приводило к уменьшению образования дисульфидов, тогда как добавление 0,05-0,1M водного раствора лимонной кислоты к смеси растворителей привело как к улучшенному растворению DP-6P, так и к ограниченному образованию дисульфидов, при значениях %площади $\leq 1\%$ на дисульфид через 2 ч после растворения лекарственного продукта. Цитратный буфер при pH 3 и концентрации 0,05-0,1M нельзя использовать для эмульгирования из-за плохого растворения пептидов (данные не показаны). Фиг. 2 представляет химическую стабильность во времени ($t=0$ и $t=2$ ч) DP, восстановленного в смеси 1 мг/мл аскорбиновой кислоты в воде, пропиленгликоля и этанола, в сравнении со смесью 0,1M лимонной кислоты в воде, пропиленгликоля, этанола и Cremophor EL.

Испытание восстанавливающих композиций после восстановления и после последующего эмульгирования.

Cremophor EL в качестве эмульгатора менее предпочтителен в вакцинных композициях из-за сообщений о побочных эффектах при более высоких дозах. Однако растворяющие и эмульгирующие свойства Tween 80, циклодекстринов и Triton X в качестве альтернативы Cremophor EL были недостаточными (данные не показаны). При визуальном осмотре многообещающие результаты были получены с комбинацией пропиленгликоля, этанола, лимонной кислоты в WFI и 2% Tween20. Результаты экспериментов по эмульгированию, приведенные в табл. 4, показывают, что эмульсии, включающие пропиленгликоль и этанол в сочетании с Cremophor EL или Tween 20, дают наиболее стабильные эмульсии. Однако оказалось, что химическая стабильность в растворе как DP-6P, так и DP-7P была значительно хуже в присутствии Tween20 вместо Cremophor EL, т.е. со значениями %площади более 5% на дисульфид через 2 ч после растворения лекарственного продукта (см. хроматограммы UPLC DP-6P на фиг. 3; результаты для DP-5P и DP-7P были очень похожими (данные не показаны).

Взятые вместе, данные, представленные в табл. 4 и на 3, могут привести к выводу, что Cremophor EL является предпочтительным в качестве эмульгатора для DP-6P эмульсий с Montanide, на основании физической и химической стабильности продукта.

Чтобы продемонстрировать, что результаты, полученные для химической стабильности лекарственного продукта в растворе, могут быть приведены к химической стабильности лекарственного продукта в вакцинной эмульсии при использовании, исследовали стабильность DP-6P и DP-7P вакцинных эмульсий при использовании, и результаты представлены на фиг. 4 А, В, С и D. Эти результаты подтверждают,

что после стадии эмульгирования сохраняется химическая стабильность лекарственных продуктов в вакцинных препаратах.

Таблица 4

Скрининг растворителей с предварительно смешанными органическими и водными растворителями (1 мл)

Раствор лимонной кислоты	Органический 1	Органический 2	Органический 3	Растворимость пептидов	Физическая стабильность эмульсии
0,1 М, 800 мкл	PG (3)	EtOH (2)	Cremophor EL (1)	+	-
0,1 М, 800 мкл	PG (1)	0	Cremophor EL (1)	-	-
0,1 М, 800 мкл	PG (2)	EtOH (1)	Cremophor EL (1)	+	-
0,1 М, 800 мкл	PG (3)	EtOH (3)	Cremophor EL (2)	-	NA
0,1 М, 800 мкл	PG (1)	EtOH (1)	Cremophor EL (2)	+	-
0,1 М, 775 мкл	PG (2)	EtOH (1)	Cremophor EL (1)	-+	-
0,1 М, 750 мкл	PG (3)	EtOH (2)	Cremophor EL (1)	-+	-
0,1 М, 750 мкл	PG (1)	EtOH (2)	Cremophor EL (1)	-+	+
0,1 М, 750 мкл	0	EtOH (4)	Cremophor EL (1)	-+	-
0,1 М, 700 мкл	PG (3)	EtOH (2)	Cremophor EL (1)	-	-
0,1 М, 800 мкл	PG (1)	EtOH (2)	Tween 20 (1)	-+	+
0,1 М, 750 мкл	PG (1)	EtOH (2)	Tween 20 (1)	-+	NA
0,1 М, 600 мкл	PG (1)	EtOH (2)	Tween 20 (1)	-	NA
0,1 М, 800 мкл	PG (1)	EtOH (2)	Tween 20,	-+	+

МКЛ			50% водн. (1)		
0,1 М, 800 МКЛ	PG (1)	EtOH (2)	Tween 20, 25% водн. (1)	-+	+
0,1 М, 750 МКЛ	PG (1)	EtOH (2)	Triton X (1)	-	NA
0,1 М, 600 МКЛ	PG (1)	EtOH (2)	Triton X (1)	-	NA
0,05 М, 800 МКЛ	PG (1)	EtOH (1)	Cremophor EL (2)	+	-
0,05 М, 775 МКЛ	PG (2)	EtOH (1)	Cremophor EL (1)	-+	-
0,05 М, 750 МКЛ	PG (2)	EtOH (1)	Cremophor EL (1)	-+	+
0,05 М, 700 МКЛ	PG (2)	EtOH (1)	Cremophor EL (1)	-	++

Тонкая настойка для устойчивости при эмульгировании.

Растворимость пептидов и стабильность эмульсии Осуществляли последующие серии экспериментов, в которых изменяли соотношение PG/EtOH/Cremophor EL, испытывали две разные концентрации раствора лимонной кислоты, использовали разные способы эмульгирования и изменяли соотношение органических vs. водных компонентов смеси. Обычно получали 1 мл восстанавливающей композиции путем смешивания органических и водных растворителей перед добавлением их к лиофилизированному лекарственному продукту. Затем получали эмульсию путем добавления 1 мл Montanide к 1 мл водного пептидного раствора с использованием различных стадий смешивания и/или соединителей, как указано в табл. 5 и 6.

Табл. 5.

Изменения в способе эмульгирования с использованием разных восстанавливающих композиций:

A=800 мкл 0,05М лимонной кислоты и 200 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (1:1:2);

B=800 мкл 0,05М лимонной кислоты и 200 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (2:1:1);

C=750 мкл 0,1М лимонной кислоты и 250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (2:1:1);

D=750 мкл 0,1М лимонной кислоты и 250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (1:2:1);

E=700 мкл 0,1М лимонной кислоты и 300 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (2:1:1).

Таблица 5

Способ эмульгирования	Буферная композиция	Растворимость пептидов	Стабильность эмульсии
20 медленных* циклов и 80 быстрых* циклов	A	+	-
40 циклов за 40 сек	A	+	-
20 медленных циклов и 80 быстрых циклов	B	+	-
10 медленных циклов и 40 быстрых циклов	B	+	-
20 медленных циклов и 80 быстрых циклов	C	+-	+
10 медленных циклов и 40 быстрых циклов	C	+-	+-
20 медленных циклов и 40 быстрых циклов	C	+-	+
40 быстрых циклов	C	+-	+
40 быстрых циклов	D	+-	+
20 медленных циклов и 40 быстрых циклов	E	-	++
40 быстрых циклов	E	-	++

*Медленные циклы: 2 с на цикл

Быстрые циклы: 1 с на цикл

Более подробно относительно стабильности пептидной эмульсии: PSD анализ методом лазерной дифракции. Для пяти разных восстанавливающих композиций эффект разных способов эмульгирования на размер частиц анализировали методом лазерной дифракции с использованием Malvern Mastersizer 2000. Для всех образцов получали 1 мл восстанавливающей композиции путем смешивания органических и водных растворителей перед их добавлением к лиофилизированному лекарственному продукту. Затем получали эмульсию путем добавления 1 мл Montanide к 1 мл водного пептидного раствора. Смешивание органической и водной фаз осуществляли тремя разными способами:

используя Т-соединитель и осуществляя циклы смешивания, как указано в табл. 6;

используя I-соединитель и осуществляя циклы смешивания, как указано в табл. 6; или

добавляя 1 мл Montanide в сосуд, содержащий пептидный раствор в восстанавливающей композиции, и перемешивая вихревым способом смесь в течение 30 с.

Обобщенные результаты представлены в табл. 6. Представлены приближенные значения для D(0,5) (распределение по объему).

Табл. 6.

Характеристики эмульгирования пептидных композиций и средние D(0,5) значения с использованием разных восстанавливающих композиций:

A=600 мкл 0,1М лимонной кислоты и 400 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (5:4:2);

B=750 мкл 0,1М лимонной кислоты и 250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (2:1:1);

C=750 мкл 0,1М лимонной кислоты и 250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (1:2:1);

D=775 мкл 0,1М лимонной кислоты и 225 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (2:1:1);

E=800 мкл 0,1М лимонной кислоты и 200 мкл PG/EtOH/Cremophor EL (2:1:1).

Таблица 6

Восстанавливающая композиция	Способ эмульгирования	Растворимость	D(0,5)	Стабильность
А	Т-соединитель, 20 медленных и 80 быстрых циклов	-	3 мкм	≥3ч
А	Перемешивание вихревым способом 30 секунд	-	11 мкм	3ч
В	Т-соединитель, 20 медленных и 80 быстрых циклов	+-	5-7 мкм*	≥3ч
В	Т-соединитель, 40 быстрых циклов	+-	9 мкм	≥3ч
В	І-соединитель, 10 медленных и 40 быстрых циклов	+-	11 мкм	≥2ч
С	Т-соединитель, 40 быстрых циклов	+-	4 мкм	≥2ч
Д	Т-соединитель, 40 быстрых циклов	+-	11 мкм	1ч
Е	Т-соединитель, 20 медленных и 80 быстрых циклов	+	11 мкм	1ч
Е	І-соединитель, 20 медленных и 80 быстрых циклов	+	12 мкм	1ч

*Изменения в PSD наблюдали для анализа при разбавлении в WFI или разбавлении в 0,01M растворе лимонной кислоты

Как из табл. 5, так и из табл. 6 видно, что не было обнаружено различий в стабильности эмульсии между различными способами смешивания и/или различными типами используемых соединителей. Однако взбалтывание смеси вместо использования соединителя приводило к эмульсиям с гораздо большим размером частиц, что менее благоприятно для стабильности. Как правило, эмульсии с меньшим размером частиц более стабильны.

Кроме того, стабильность эмульсии улучшалась при увеличении доли органической фракции (смеси) в общем объеме восстанавливающей композиции. Однако самые высокие объемы содержания органических веществ, которые были испытаны (300-400 мкл), приводили к снижению растворимости лекарственного продукта. Поэтому оптимальное содержание органических веществ составляло от 200 до 300 мкл на мл (приблизительно 250 мкл) восстанавливающей композиции. Кроме того, изменение концентрации раствора лимонной кислоты (0,05 или 0,1 М), по-видимому, не влияло на стабильность эмульсии, тогда как при использовании 0,1 М раствора лимонной кислоты было получено немного лучшее растворение DP-6P.

Анализ размеров частиц с использованием метода визуализации микропотока.

Для более подробного исследования эффекта концентрации лимонной кислоты на стабильность эмульсии и размер частиц эмульсии осуществляли дополнительные эксперименты с использованием анализа размера частиц, используя растворитель, который приводил к наименьшему размеру частиц по-

сле эмульгирования с 1 мл Montanide, т.е. восстанавливающей композиции с соотношением органической и водной фаз 1:3, где органическая фаза содержит PG, EtOH и Cremophor EL в соотношении PG:EtOH:Cremophor EL равным 1:2:1 (табл. 6). Осуществляли эксперименты по прямому сопоставлению, где молярное количество лимонной кислоты в водной фазе варьировалось (0,05 и 0,1М лимонной кислоты, т.е. конечная концентрация лимонной кислоты в восстанавливающей композиции 0,038 и 0,075М лимонной кислоты, соответственно). DP-6P растворяли в 1 мл такой восстанавливающей композиции, с последующим эмульгированием с 1 мл Montanide, с использованием способа с Т-соединителем и осуществляя 50 быстрых циклов смешивания. В этих экспериментах анализировали как растворение лекарственного продукта, так и размер частиц и стабильность эмульсии. Осуществляли анализ методом визуализации микропотока (MFI) с использованием MFI 5200 для визуализации частиц при помощи камеры, чтобы отклонения можно было исследовать визуально. PSD-сравнение 0,05 и 0,1М лимонной кислоты восстанавливающей композиции с лимонной кислотой показаны на фиг. 5.

Как видно из фиг. 5, концентрация раствора лимонной кислоты не влияет на PSD эмульсии. Однако растворение лекарственного продукта было немного лучше при использовании 0,1М лимонной кислоты. Фиг. 6 представляет результаты MFI трех независимых препаратов эмульсии DP-6P (фиг. 6, панель А) или двух независимых препаратов, проанализированных в двух разных точках времени после получения (фиг. 6, панель В), в которых лекарственный продукт был восстановлен с использованием одной и той же комбинации растворителей (750 мкл 0,05М лимонной кислоты+250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL 1:2:1). Были получены очень стабильные результаты PSD. Кроме того, все эмульсии были стабильны в течение по меньшей мере 2 ч.

Применение предпочтительного восстанавливающего растворителя и способа эмульгирования для DP-6P и DP-7P.

Поскольку было показано, что 750 мкл раствора лимонной кислоты+250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL 1:2:1 дают стабильные результаты PSD для DP-6P эмульсий, а использование 0,1М лимонной кислоты приводит к лучшему растворению лекарственного продукта, эта комбинация растворителей была тщательно протестирована для получения DP-6P и DP-7P эмульсий.

Эмульсии DP-6P и DP-7P получали в соответствии с инструкциями табл. 1. Вкратце, 1 мл восстанавливающей композиции (750 мкл 0,1М лимонной кислоты+250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL 1:2:1) добавляли к лиофилизированному лекарственному продукту, полученный раствор смешивали с 1 мл Montanide с использованием Т-соединителя и применяя 50 циклов быстрого перемешивания. PSD значения для MFI анализа приведены в ECD (эквивалентный диаметр круга), и приведено распределение по номерам препарата. Следует отметить, что MFI и лазерная дифракция являются взаимодополняющими методами. Следовательно, прямое сравнение значений среднего размера частиц с использованием метода лазерной дифракции и MFI невозможно.

Таблица 7

DP-6P Размер частиц D (0,5), значения в мкм

	T=0	T=1	T=2	T=3
Prep 1	1,77	1,71	1,70	1,71
Prep 2	1,73	1,62	1,69	1,69
Prep 3	1,61	1,73	1,75	1,69
Среднее значение	1,70	1,69	1,71	1,70

Таблица 8

DP-7P Размер частиц D (0,5), значения в мкм

	T=0	T=1	T=2	T=3
Prep 1	1,64	1,59	1,56	1,59
Prep 2	1,59	1,61	1,61	1,57
Prep 3	1,65	1,66	1,63	1,55
Среднее значение	1,63	1,62	1,60	1,57

Табл. 7 и 8 показывают, что с использованием восстанавливающей композиции, включающей 750 мкл 0,1М лимонной кислоты+250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL 1:2:1 (т.е. 750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL), можно получить обе DP-6P и DP-7P эмульсии, которые будут стабильными в течение по меньшей мере 3 ч.

Пример 2.

Введение.

Терапевтическая эффективность SLP вакцинации в комбинации с CpG1826 была ранее продемон-

рирована у мышей с установленными TC-1 опухолями, которые экспрессируют онкогенные E6 и E7 белки HPV16 (Zwaveling et al., J. Immunol. (2002) 169:350-358). Для оценки, сохраняют ли SLP функциональность в наиболее оптимальной композиции, определенной в примере 1 (750 мкл 0,1М лимонной кислоты+250 мкл PG/EtOH/Cremophor EL 1:2:1), мышам с TC-1 опухолью с SLP, включающими D^b-рестриктивный CTL эпитоп RAHYNIVTF (представленный SEQ ID NO: 67), вводили терапевтическую вакцину, восстановленную либо в DMSO/WFI, либо в новой восстанавливающей композиции. Все вакцины затем эмульгировали в Montanide. Разрастание опухоли контролировали в течение 75 дней. На пике вакцина-индуцированного Т-клеточного ответа определяли процент и фенотип RAHYNIVTF-специфических CD8⁺ Т-клеток в крови. SLP, восстановленные в DMSO/WFI и новой восстанавливающей композиции, показали одинаковую эффективность в индукции регрессии TC-1 опухоли. Мыши, вакцинированные композицией SLP, восстановленной в новом растворе, показали более высокий процент RAHYNIVTF-специфических CD8⁺ Т клеток в крови.

Материалы.

Таблица 9

Материалы, используемые в эксперименте оценки TC-1 опухоли

Материал	Источник/поставщик
C57BL/6 самки мышей, возраст 6-8 недель	Harlan Laboratories
Montanide ISA VG51	Seppic; партия 2384535/U40740; exp 13FEB17
CpG ODN1826 (5мг/мл)	Invivogen; кат. № tlrl-1826
DMSO	Mylan; партия № 140706; exp JUN2017
WFI	Fresenius Kabi; W005 4B03; exp 6MAR18
KLRG1-PeCy7	eBioscience; кат. № 25-5893-82
CD62L-Alexa780	eBioscience; кат. № 47-0621-82
CD44-Pacific Blue	BioLegend; кат. № 103020
CD127-Биотин	eBioscience; кат. № 13-1271-85
CD8a-Alexa700	eBioscience; кат. № 56-0081-82
CD3-V500	BD; кат. № 560771
Стрептавидин-Qdot605	ThermoFischer; кат. № Q10101MP
7-AAD окрашивание для определения жизнеспособности	ThermoFisher, кат. № A1310; exp 22SEP16
D ^b -RAHYNIVTF тетрамер	Продукция LUMC
Трипсин	Gibco (Life Technologies) с кат. № 25200-056
Генетицин (G418)	Gibco (Life Technologies) кат. №

	10131-027
BSA	Roche Diagnostics; кат. № 10735078001
Лизисный буфер	LUMC Pharmacy
Т-соединитель Discifix C	B Braun; 16494C
2-мл шприцы с люэровским замком NORM-JECT	HSW; 4010-000V0
1-мл шприцы с люэровским замком NORM-JECT	HSW; 4010-200V0
BD Microlance 3; 25G (0,5 × 16мм)	BD; кат. № 300600
Предметы разового пользования	Различные; LUMC

Способы.

Получение вакцины.

Следующие группы мышей были включены в исследование.

Группа 1: (n=5) 40% об./об. смеси DMSO/WFI, эмульгированной 1:1 с Montanide ISA VG51.

Группа 2: (n=5) восстанавливающая композиция (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL на мл), эмульгированная 1:1 с Montanide ISAVG51.

Группа 3: (n=10) смесь SLP GQAEPPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRLCVQSTHVDIR и 20 мкг CpG ODN1826/мышь, растворенная в 40% об./об. DMSO/WFI, эмульгированная 1:1 с Montanide ISAVG51.

Группа 4: (n=10) смесь SLP GQAEPPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRLCVQSTHVDIR (SEQ ID NO: 6) и 20 мкг CpG ODN1826/мышь, растворенная в восстанавливающей композиции (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде, 62,5 мкл пропиленгликоля, 125 мкл этанола и 62,5 мкл Cremophor EL на мл), эмульгированная 1:1 с Montanide ISA VG51.

Для мышей в группе 1 раствор получали путем смешивания 400 мкл DMSO и 600 мкл WFI и последующего взбалтывания. Раствор забирали в 2 мл шприц с люэровским замком (шприц А). В другой 2 мл шприц с люэровским замком (шприц В) забирали 1 мл Montanide ISA VG51, после чего оба шприца соединяли с Т-соединителем. Эмульсию получали путем интенсивного перемешивания содержимого взад и вперед. После смешивания шприцы отсоединяли, и в шприц, содержащий эмульсию, вставляли иглу 25G. Каждой мыши подкожно вводили 100 мкл в левый бок.

Вакцину для группы 2 получали идентичным образом, отличием было только использование восстанавливающей композиции (750 мкл 0,1М лимонной кислоты в воде и 250 мкл PG/EtOH/ Cremophor EL 1: 2:1, т.е. 0,075М лимонной кислоты 6,25% об./об. пропиленгликоля CAS № 57-55-6, 12,5% об./об. этанола и 6,25% об./об. полиоксиэтиленглицерилтририцинолеата 35 CAS № 61791-12-6 в воде) вместо DMSO и WFI. Вакцину для группы 3 получали, сначала растворяя содержимое сосуда, содержащего 1,5 мг SLP, представленного SEQ ID NO: 6 (GQAEPPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRLCVQSTHVDIR), в 400 мкл DMSO. SLP получали путем твердофазного пептидного синтеза Fmoc (Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, W.C. Chan, P.D. White Eds, Oxford Univ. Press 2000). Затем 520 мкл WFI и 80 мкл CpG ODN1826 (исходный раствор 5 мг/мл) добавляли к пептиду в DMSO. После забора этого раствора в 2 мл шприц с люэровским замком следовали тому же протоколу приготовления вакцины, как для группы 1, путем эмульгирования с Montanide ISA VG51. Приготовление вакцины для группы 4 осуществляли в соответствии с протприблизительном для группы 3, с отличием только на первой стадии, где содержимое сосуда, содержащего 1,5 мг SLP SEQ ID NO: 6, растворяли в 920 мкл восстанавливающей композиции и добавляли 80 мкл CpG ODN1826 (исходный раствор 5 мг/мл).

Терапевтическая вакцинация.

ТС-1 опухолевые клетки, экспрессирующие онкогенные белки Е6 и Е7 HPV16, культивировали в полной культуральной среде IMDM, дополненной 400 мкг/мл генетина. В день 0 клетки ТС-1 собирали с использованием трипсина и трижды промывали PBS/0,1% BSA. Сразу после сбора 100000 ТС-1 клетки инъецировали в правый бок 40 самкам мышей C57BL/6. На 8-й день все мыши были п/к вакцинированы в левый бок, как описано в разделе Получение вакцины. Размер опухоли всех мышей контролировали по меньшей мере два раза в неделю с использованием штангенциркуля вплоть до 75 дней после заражения опухолью. Исследование осуществляли, как показано на фиг. 7.

Измерение уровня Т-клеточного ответа в крови.

На 9-й день после вакцинации кровь брали из хвостовой вены у всех мышей. Образцы крови переносили в 96-луночный культуральный планшет и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 об/мин. Эритроциты лизировали путем суспендирования клеточного осадка в буфере для лизиса до тех пор, пока не появлялось оранжевое окрашивание. Затем клетки промывали в FACS буфере и окрашивали флуоресцентными антителами, D^b-RAHYNIVTF-APC тетрамером и 7-AAD, указанными в разделе Материалы выше. После 30-мин инкубации на льду клетки промывали и анализировали на проточном цитометре BD LSRII в Медицинском центре Лейденского университета (отделение ревматологии).

Результаты.

Разрастание опухоли одинаковое между вакцинированными группами.

Контролируя размер опухоли по меньшей мере два раза в неделю, можно построить кривую роста для каждой отдельной мыши. На фиг. 8 разрастание опухолей показано для разных групп. Регрессия опухоли наблюдается у всех мышей, вакцинированных SLP6 и CpG1826. Опухоли в контрольных группах, получающих только носитель, либо DMSO/WFI и Montanide, либо восстанавливающую композицию и Montanide, быстро растут. Помимо естественных изменений, никаких четких различий между обеими вакцинированными SLP группами не наблюдают. См. график выживания Каплана-Мейера на фиг. 9А, показывающий отсутствие различий между вакцинированными группами.

Индукцированные вакциной тетрамер-положительные CD8⁺ Т-клетки.

Фиг. 9В показывает процент индуцированных D^b-RAYNIVTF (тетрамер)-положительных CD8⁺ Т-клеток. Мыши в группе 4 (восстанавливающая композиция+SLP) показывают усиленный тетрамер-положительный CD8⁺ Т-клеточный ответ, что указывает на то, что SLP и CpG, сформулированные в композиции для восстановления, более эффективны, чем SLP и CpG, сформулированные в эмульсии DMSO/WFI и Montanide, для праймирования специфических мышинных CD8⁺ Т-клеток. В табл. 9 приведены средние проценты и стандартные отклонения для каждой группы.

Значимую разницу определяли с использованием критерия Стьюдента для одной выборки, с получением р-значения=0,022 между группами 3 и 4.

Экспрессия Klrp1 И Cd62l указывают на благоприятный профиль противоопухолевой активности после Slp бвакцинации.

Исследование Van Duikeren et al. (J Immunol, 2012; 189 (7): 3397-403) имело целью определение параметров, которые коррелировали с индукцией эффективного противоопухолевого ответа. Путем идентификации таких биомаркеров можно тестировать различные вакцинные композиции на мышах, не имеющих опухоли, с прогностической ценностью в моделях опухолей. Авторы обнаружили корреляцию между экспрессией KLRG1 и отсутствием экспрессии CD62L, с одной стороны, и эффективными противоопухолевыми иммунными ответами, с другой стороны. Определяли процент KLRG1-и CD62L-экспрессирующих D^b-RAHYNIVTF⁺ CD8⁺ Т-клеток в крови вакцинированных мышей в день 9 после вакцинации с использованием проточной цитометрии. Никаких различий между группами 3 и 4, что касается процента RAHYNIVTF-специфических KLRG1⁺ CD62L⁺ CD8⁺ Т-клеток, не наблюдали. Не было обнаружено достаточное количество RAHYNIVTF-специфических CD8⁺ Т-клеток, чтобы достоверно исследовать экспрессию KLRG1 и CD62L в группах мышей, вакцинированных только носителем (группа 1 и 2). В табл. 10 приведены средние проценты и стандартные отклонения для каждой группы.

Табл. 10.

Средние проценты и SD тетрамер⁺ CD8⁺ Т-клеток и средние значения и проценты экспрессии CD62L и KLRG1 на тетрамер⁺ CD8⁺ Т-клетках в группах мышей, вакцинированных SLP. * означает значимую разницу (p<0,05) между группами 3 и 4, определенную с использованием критерия Стьюдента для одной выборки.

Таблица 10

Группа		% TM ⁺ CD8 Т-клеток		
		% Tm+ CD8	% CD62L-KLRG1+	% CD62L+ KLRG1+
1	Среднее	0,1	#	#
	SD	0		
2	Среднее	0,1	#	#
	SD	0,1		
3	Среднее	1,4	51,9	4,0
	SD	1,0	14,9	3,2
4	Среднее	4,8*	52,2	4,0
	SD	3,8	16,6	2,0

Обсуждение.

Не наблюдалось никаких отличий в общем росте опухоли между группами мышей, вакцинированных SLP 6, растворенными либо в DMSO/WFI, либо в восстанавливающей композиции. Действительно наблюдалось усиление индукции специфических CD8⁺ Т-клеток у мышей, вакцинированных SLP, растворенными в композиции для восстановления, по сравнению с группой мышей, вакцинированных SLP, растворенными в DMSO/WFI.

Адъювантные свойства Montanide были приписаны образованию антигенного депо и индукции локального воспаления и гибели клеток, что способствует созреванию антиген-презентирующих клеток. Повышенная индукция тетрамер⁺ CD8⁺ Т-клеток в группе мышей, вакцинированных SLP, растворенными в композиции для восстановления, позволяет предположить, что комбинация этого раствора с Montanide образует эмульсию с полезными свойствами высвобождения антигена или локальной стимуляции антиген-презентирующих клеток. Благоприятный профиль экспрессии KLRG1 и отсутствие CD62L были сходными в обеих группах мышей, вакцинированных SLP. Данные показывают, что SLP, восстановленные в восстанавливающей композиции по изобретению, сохраняют свою иммуногенную способность по сравнению с ранее используемой восстанавливающей композицией (DMSO/WFI).

Пример 3.

Материалы.

Использовали следующую лиофилизированную пептидную композицию:

P53 DP5P: включающая пептиды, представленные SEQ ID NO: 191, 193, 194, 201 и 203.

Использовали следующие химические продукты: Cremophor EL (Sigma Aldrich. Kolliphor EL); пропиленгликоль (≥99,5%. Sigma Aldrich); этанол (Абсолютный. VWR Emprove® Ph Eur. BP.USP); лимонная кислота (≥99%. Sigma Aldrich); MilliQ вода; Стерильный Montanide ISA 51VG (SEPPIC.)

Использовали следующее оборудование: шприцевые экструзионные устройства (Discofix-3 Т-соединитель, B. Braun); DMSO-стойкие шприцы (NORM-JECT 2-мл с люэровским замком, Henke Sass Wolf); ВЭЖХ/МС система EQP-004 Waters; Protein Simple MFI 5200

Способы.

Получение вакцинной эмульсии и эмульсии плацебо осуществляли, как описано в табл. 1.

Анализ химической стабильности осуществляли при помощи ВЭЖХ-МС, как описано в примере 1, в разделе, описывающем способы для анализа химической стабильности HPV-DP-6P и HPV-DP-7P вакцинных эмульсий при использовании, включающие экстракцию пептидов из вакцинной эмульсии.

Анализ размеров частиц осуществляли методом визуализации микропотока. Перед анализом получали разбавленную вакцинную эмульсию путем добавления 10 мкл эмульсии к 10 мл восстанавливающего раствора и смешивания до гомогенности, с последующим 1:500 разведением этого раствора в восстанавливающем растворе.

Параметры анализа MFI 5200.

Способ: DS500.2.

Объем образца: 1 мл.

Вытесняемый объем: 0,20 мл.

Анализ: 0,68 мин или 1000000 частиц.

Последующие циклы: 1.

Результаты выражены в виде Эквивалентного диаметра круга (ECD), и приведено распределение по номерам препарата. Частицы ≥15 мкм отфильтровываются от результатов, поскольку, как известно, они являются артефактами, а не частицами эмульсии.

Результаты.

Чистота восстановленного лекарственного продукта.

Чистоту лекарственного продукта в разных точках времени рассчитывали следующим образом:

Чистота (%) = 100% - Суммарное количество примесей ≥ 0,05% площади

Анализ чистоты P53-DP-5P вакцинного продукта при использовании представлен в табл. 11.

Таблица 11

**Анализ чистоты восстановленного P53-DP-5P при хранении
при комнатной температуре**

ПРОДУКТ:	P53-DP-5P			
	ВРЕМЯ ХРАНЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ			
ТЕСТИРОВАНИЕ	t=0ч	t=1ч	t=2ч	t=3ч
Чистота [%площади]	93,4	91,6	90,9	89,8
Общее количество родственных примесей (≥0,05%) [%площади]	6,6	8,4	9,1	10,2

Как можно видеть из табл. 11, чистота лекарственных продуктов медленно снижается, но все еще ≥90,0% через 2 ч после получения вакцины. Иллюстративные хроматограммы ВЭЖХ анализа вакцины при t=0 и t=24 представлены на фиг. 10.

Идентификацию основных пиков и примесей с площадью ≥1,0% площади осуществляли с использованием масс-спектрометрии. Все родственные примеси с площадью ≥1,0% площади указываются и идентифицируются путем сравнения t/z значений с молекулярными массами последовательностей пептидов и их известных и ожидаемых модификаций. Общее описание родственных примесей при использовании P53-DP-5P при хранении вплоть до 3 ч представлено в табл. 12.

Таблица 12

**Общее описание и идентификация родственных примесей восстановленного
P53-DP-5P. Стабильность при использовании вплоть до 3 ч после восстановления**

	Время удержива- ния (мин)	Время хранения при использовании				SEQ ID NO
		t=0ч	t=1ч	t=2ч	t=3ч	
Пептиды и родственн ые примеси (≥0,05%) [%площади]	4,97	13,0 0	12,0 2	11,8 7	11,6 3	194
	7,99	12,4 3	11,7 3	11,7 2	11,6 0	201
	9,57	23,9 0	22,3 8	22,3 1	22,1 9	193
	14,14	30,3 7	28,7 5	28,8 1	28,8 1	191
	16,82	<	1,05	1,54	1,87	203 внутримолекулярный дисульфид
	19,46	13,7 3	16,7 3	16,2 1	15,5 6	203

Восстановление лекарственного продукта из эмульсии.

Восстановление мелких отдельных пептидов, присутствующих в P53-DP-5P, из эмульсии подтверждали путем сравнения сигналов эмульгированного и неэмульгированного образцов. Результаты представлены в табл. 13.

Таблица 12

Общее описание и идентификация родственных примесей восстановленного P53-DP-5P. Стабильность при использовании вплоть до 3 ч после восстановления

	Время хранения при использовании				SEQ ID NO
	t=0ч	t=1ч	t=2ч	t=3ч	
Восстановление (RSD)	97 (0,6)	97 (0,8)	96 (2,4)	94 (2,3)	194
Оба значения представлены как %	101 (2,0)	103 (3,8)	104 (5,1)	102 (5,1)	201
	98 (0,6)	99 (1,1)	99 (1,9)	98 (1,3)	193
	96 (0,3)	98 (1,4)	99 (1,7)	98 (1,1)	191
	70 (8,6)	92 (3,4)	90 (4,4)	86 (4,8)	203

Физическая стабильность.

Физическую стабильность анализировали при помощи анализа размера частиц с MFI. Результаты выражены в виде Эквивалентного диаметра круга (ECD). Средний размер частиц представлен в табл. 14, рассчитанный из распределения по номерам препаратов.

Таблица 14

Средний размер частиц (ECD в мкм) P53 DP5P вакцинных эмульсий

	T=0ч	T=1ч	T=2ч	T=3ч
Prep 1	1,91	1,95	1,93	2,01
Prep 2	1,85	1,90	1,92	1,93
Среднее значение	1,88	1,93	1,93	1,97

Заключение.

Растворение было успешным для смеси, содержащей 5 SLP, происходящих из P53 антигена (P53 DP-5P).

Была исследована как химическая, так и физическая стабильность вакцинного продукта. Анализ родственных примесей и расчет чистоты, представленные в табл. 11 для P53 DP-5P, показывают, что чистота лекарственного продукта составляет $\geq 90,0\%$ через 2 ч после приготовления вакцины. Было обнаружено только одно родственное соединение с %площади пика $\geq 1\%$. МС-идентификация показала, что этот пик представляет собой внутримолекулярный дисульфид пептида, представленного в SEQ ID NO: 203.

Физическую стабильность вакцинного продукта P53 DP-5P исследовали путем мониторинга его размеров частиц с использованием MFI. Результаты анализа размеров частиц представлены в табл. 14 и показывают, что размер частиц не изменяется вплоть до трех часов после приготовления вакцины. Кроме того, все вакцинные продукты подвергались визуальному контролю во время исследования стабильности, и не наблюдалось никакого фазового разделения ни в какой точке времени.

Пример 4.

Материалы и способы.

Использовали следующую лиофилизированную пептидную композицию.

PRAME DP5P: включающая пептиды, представленные SEQ ID NO: 153, 155, 156, 160 и 166.

Группа, состоящая из пяти PRAME-происходящих пептидов, была выбрана на основании ВЭЖХ времени удерживания, варьирования аминокислотного состава и растворимости в восстанавливающем растворе, как определяли путем визуального наблюдения.

Другие используемые материалы и способы были такими же, как в примере 3.

Результаты.

Чистота восстановленного лекарственного продукта.

Чистоту лекарственного продукта в разных точках времени рассчитывали следующим образом:

Чистота (%) = $100\% - \text{Суммарное количество примесей} \geq 0,05\%$ площади

Данные анализа чистоты вакцинного продукта PRAME-DP-5P при использовании приведены в табл. 15. Следует отметить, что чистота лиофилизированного PRAME-DP-5P уже ниже 90%. Тем не менее, очень ограниченное снижение чистоты с течением времени демонстрирует хорошую химическую стабильность этого восстановленного лекарственного продукта.

Таблица 15

Чистота восстановленного PRAME-DP-5P при хранении при комнатной температуре

ПРОДУКТ:	PRAME-DP-5P			
	Время хранения при использовании			
Тестирование	t=0ч	t=1ч	t=2ч	t=3ч
Чистота [%площади]	82,9	83,7	82,5	82,2
Общее количество родственных примесей (≥0,05%) [%площади]	17,1	16,3	17,5	17,8

Низкое снижение чистоты с течением времени указывает на высокую химическую стабильность. Примеси с площадью ≥1,0% в PRAME-DP-5P уже присутствовали в смеси до восстановления. Поскольку в этом исследовании стабильности не наблюдалось значительного увеличения количества этих примесей, идентификация примесей не проводилась. Итоговый обзор родственных примесей для хранения PRAME-DP-5P при использовании в течение 3 ч приведен в табл. 16.

Таблица 16

Результаты анализа и идентификация родственных примесей восстановленного PRAME-DP-5P. Стабильность при использовании вплоть до 3 ч после восстановления

	Время удерживания (мин)	Время хранения при использовании				SEQ ID NO
		t=0ч	t=1ч	t=2ч	t=3ч	
Родственн ые примеси (≥0,05%) [%площади]	10,68	23,35	22,85	22,65	22,62	155
	17,50	13,61	13,49	13,34	13,40	160
	18,91	13,49	14,15	13,81	13,59	166
	20,05	21,89	22,70	22,51	22,59	153
	21,15	10,56	10,52	10,17	9,98	156

Восстановление лекарственного продукта из эмульсии.

Восстановление пяти отдельных пептидов, присутствующих в PRAME-DP-5P, из эмульсии подтверждали путем сравнения сигналов эмульгированного и неэмульгированного образцов. Результаты представлены в табл. 17.

Таблица 17

Общие результаты восстановления путем сравнения сигналов эмульгированного и неэмульгированного образцов

	Время хранения при использовании				SEQ ID NO
	t=0ч	t=1ч	t=2ч	t=3ч	
Восстановление (RSD)	81 (9,8)	87 (3,8)	84 (2,1)	81 (7,8)	155
Оба значения представлены как %	81 (10,4)	87 (3,7)	84 (0,9)	82 (8,2)	160
	74 (10,8)	84 (3,9)	80 (1,0)	77 (8,1)	166
	76 (10,7)	86 (3,3)	83 (0,2)	81 (8,6)	153
	78 (10,5)	84 (3,6)	80 (1,0)	76 (7,8)	156

Заключение.

Чистота PRAME DP-5P не была полностью удовлетворительной (<90%), но снижение чистоты восстановленного вакцинного продукта было очень ограниченным (чистота T=0 82,9%, T=3 ч 82,2%), подтверждающая полезность композиций, описанных в настоящем изобретении.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для восстановления высушенных пептидов, включающая или состоящая из 60-80% об./об. водного раствора, включающего органическую кислоту, 5-10% об./об. пропиленгликоля (CAS no. 57-55-6), 10-20% об./об. низшего спирта и 5-10% об./об. неионного гидрофильного поверхностно-активного вещества,

где органическая кислота представляет собой слабую органическую кислоту, имеющую pK_a от 1 до 4, где низший спирт выбран из группы, состоящей из метанола, этанола, пропанола, бутанола и пентанола;

и где неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество

а) представляет собой моно-, ди- или триглицерид и/или

б) имеет значение гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) в интервале от 9 до 14.

2. Композиция по п.1, в которой органическая кислота представляет собой лимонную кислоту.

3. Композиция по п.1, в которой органическая кислота присутствует в водном растворе в концентрации 0,05-0,1M.

4. Композиция по любому из пп.1-3, в которой низший спирт представляет собой этанол.

5. Композиция по любому из пп.1-4, в которой неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество представляет собой этоксилированный триглицерид.

6. Композиция по любому из пп.1-5, в которой неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество представляет собой этоксилированное касторовое масло.

7. Композиция по любому из пп.1-5, в которой неионное гидрофильное поверхностно-активное вещество представляет собой полиоксиэтиленглицеринтририцинолеат 35 (CAS no. 61791-12-6).

8. Композиция по п.1, включающая или состоящая из 75% об./об. водного раствора, включающего 0,1M лимонной кислоты, 6,25% об./об. пропиленгликоля (CAS no. 57-55-6), 12,5% об./об. этанола и 6,25% об./об. полиоксиэтиленглицеринтририцинолеата 35 (CAS no. 61791-12-6).

9. Фармацевтическая композиция, включающая композицию для восстановления по любому из пп.1-3 и дополнительно включающая пептиды, имеющие длину в интервале от 22 до 40 аминокислот, где пептиды включают или состоят из непрерывных последовательностей в HPV иммуногенной области E6 и/или E7.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, дополнительно включающая масляный адъювант.

11. Фармацевтическая композиция по п.9 или 10, где композиция включает по меньшей мере три разных пептида.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-11, в которой непрерывная аминокислотная последовательность включает эпитоп, включающий непрерывную аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 20-104.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-12, где композиция включает или состоит из 1-2 мг/мл пептидов в 40-60% об./об. восстанавливающей композиции и 40-60% об./об. адъювантов Мон-

tanide на основе очищенного сквалена и сквалена, эмульгированного с высокочистым маннидмоноолеатом, и причем пептиды представляют собой смесь разных пептидов, представленных SEQ ID NO: 1-5, или SEQ ID NO: 1-6, или SEQ ID NO: 7-13.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-13, в которой пептиды состоят из смеси из 5 разных пептидов, представленных SEQ ID NO: 1-5, или смеси из 7 разных пептидов, представленных SEQ ID NO: 7-13.

15. Фармацевтическая композиция по п.9 или 10, в которой пептиды

а) включают или состоят из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109-146, или

б) включают или состоят из пептида, выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 148-167, или представляют собой смесь из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 разных пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 148-167, или

с) включают Th эпитоп, который выбран из SEQ ID NO: 168-169, или

д) включают или состоят из пептида, выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 191-211, или представляют собой смесь из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 разных пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 191-211, или

е) включают или состоят из пептида, выбранного из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, определенной SEQ ID NO: 213-232, или представляют собой смесь из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 разных пептидов, выбранных из SEQ ID NO: 213-232.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.9-15 для применения в качестве лекарственного средства.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, в которой лекарственное средство представляет собой вакцину.

18. Фармацевтическая композиция для применения по п.16, где лекарственное средство представляет собой вакцину для индукции Т-клеточного ответа против по меньшей мере одного эпитопа пептидов.

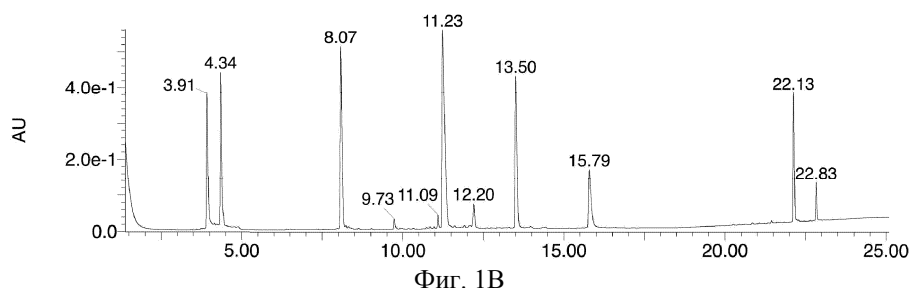
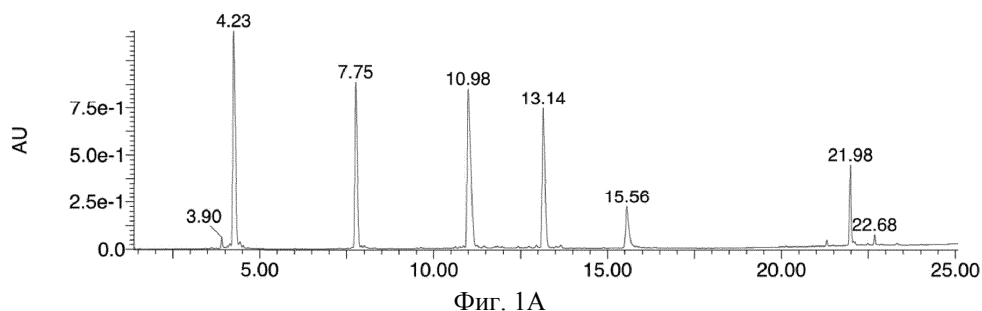
19. Набор из частей, включающий

i) первый сосуд, содержащий высушенные пептиды, имеющие длину в интервале от 22 до 40 аминокислот, где пептиды включают или состоят из непрерывных последовательностей в HPV иммуногенной области Е6 и/или Е7;

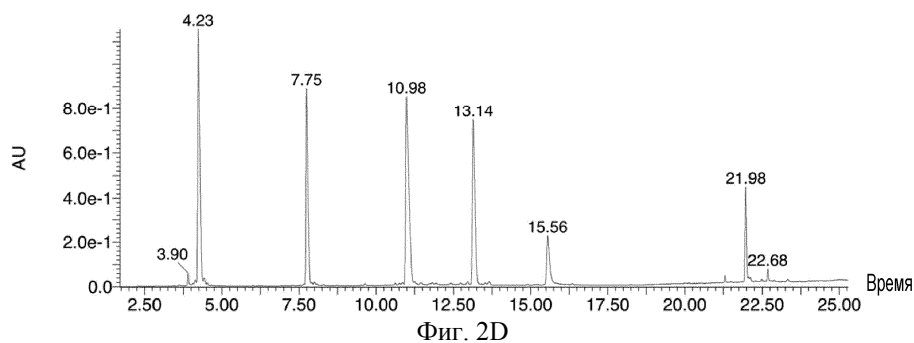
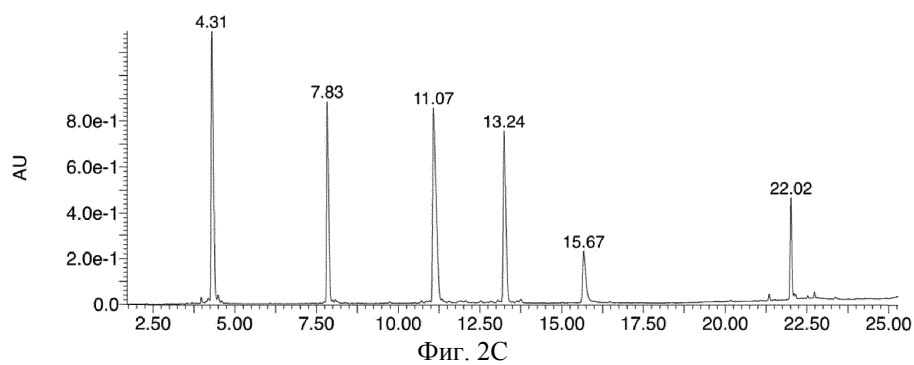
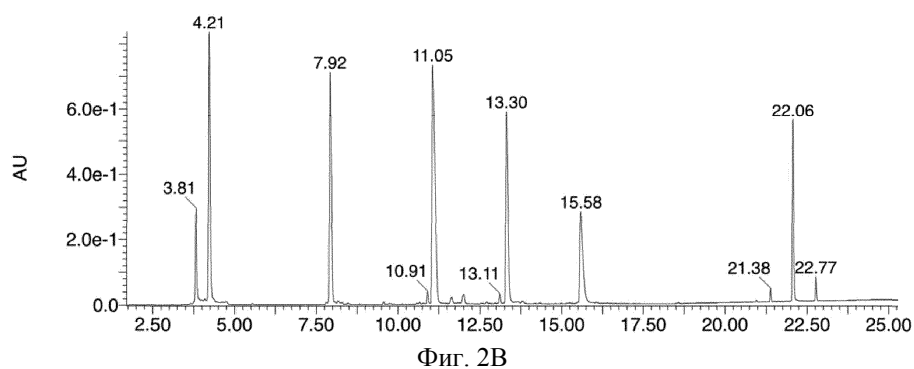
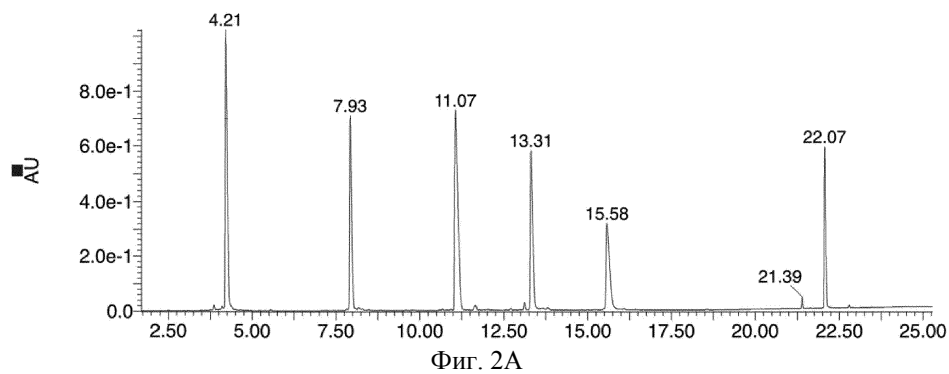
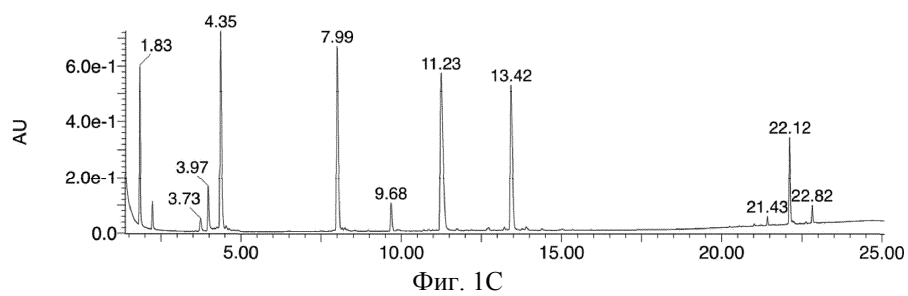
ii) второй сосуд, содержащий композицию по любому из пп.1-8.

20. Набор из частей по п.19, в котором высушенные пептиды представляют собой лиофилизированные пептиды.

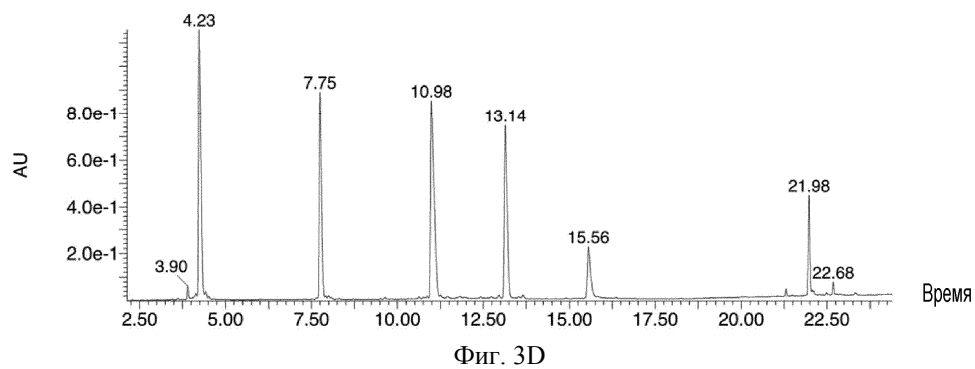
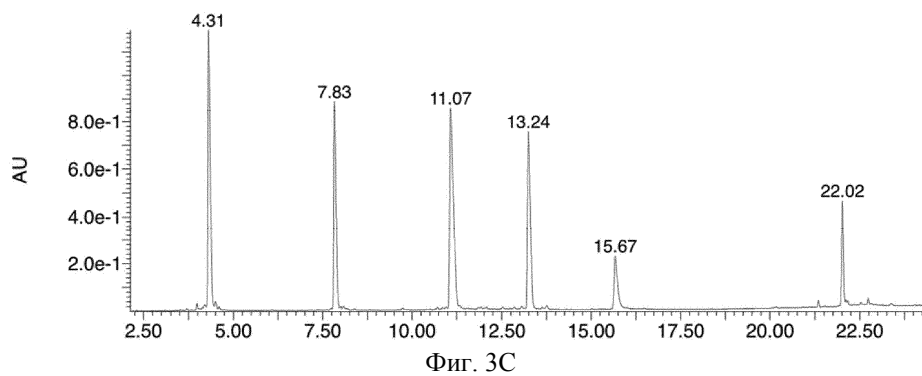
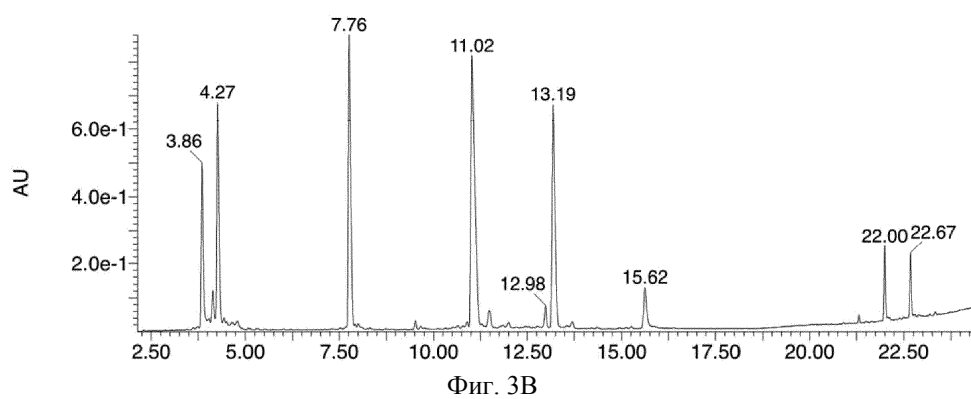
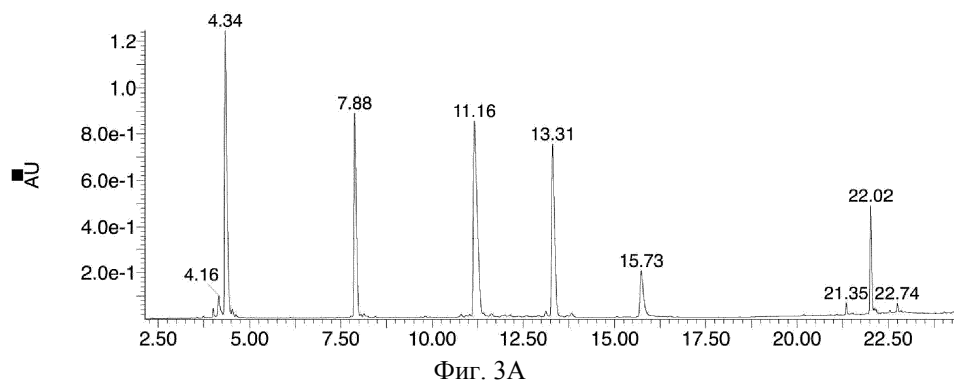
21. Набор из частей по п.19 или 20, дополнительно содержащий третий сосуд, содержащий масляный адъювант.



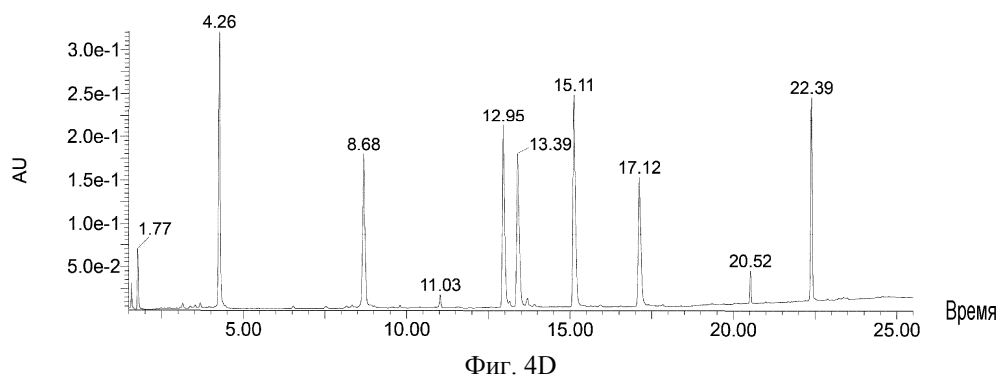
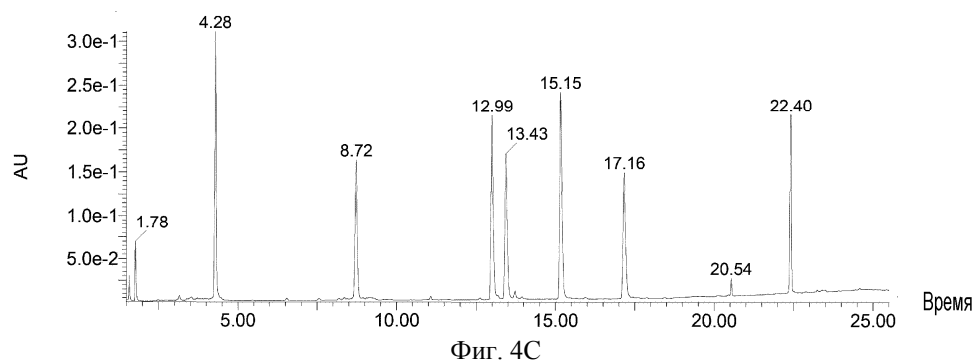
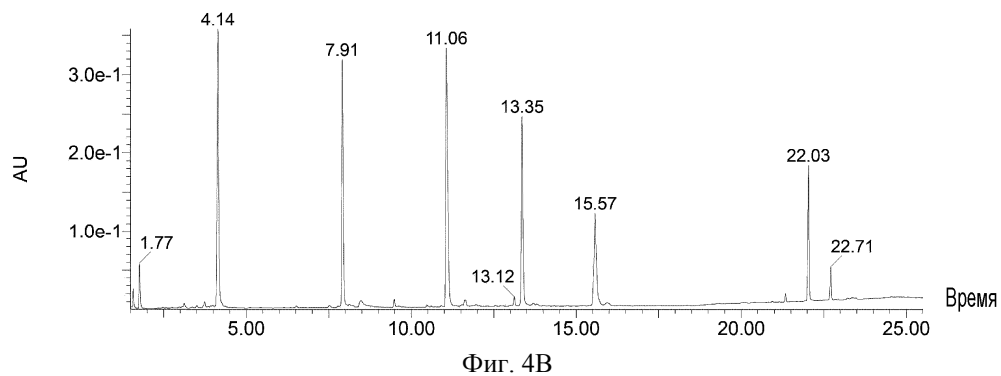
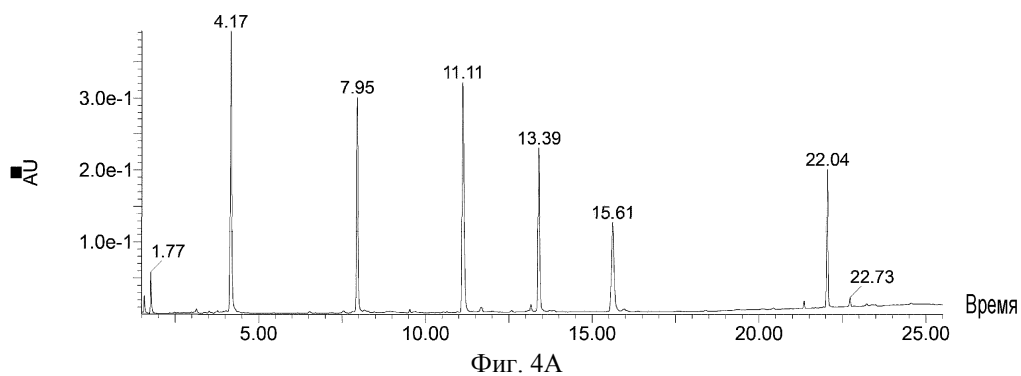
042668

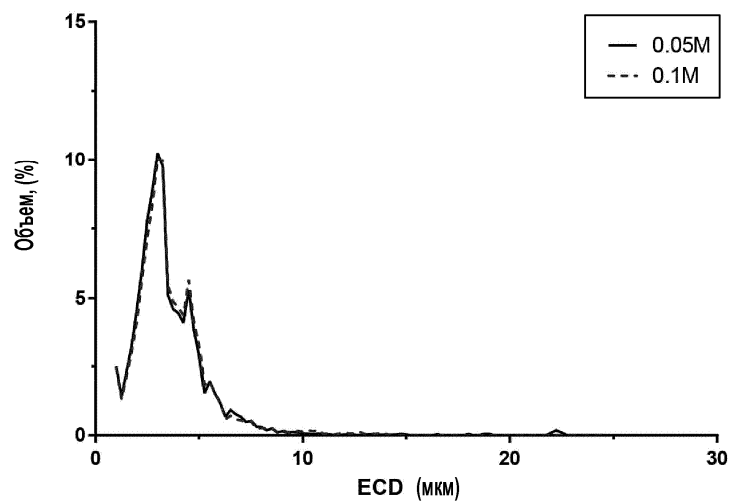


042668

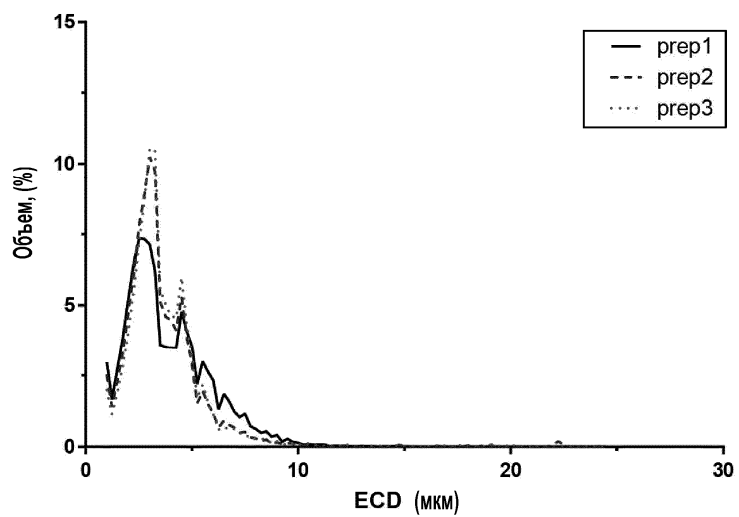


042668

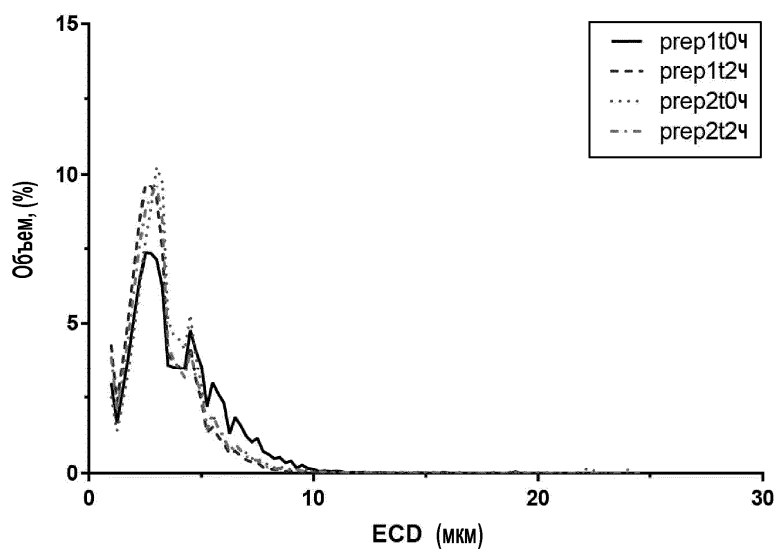




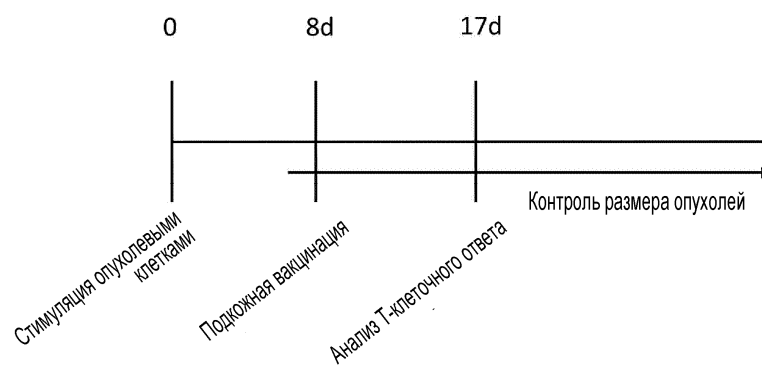
Фиг. 5



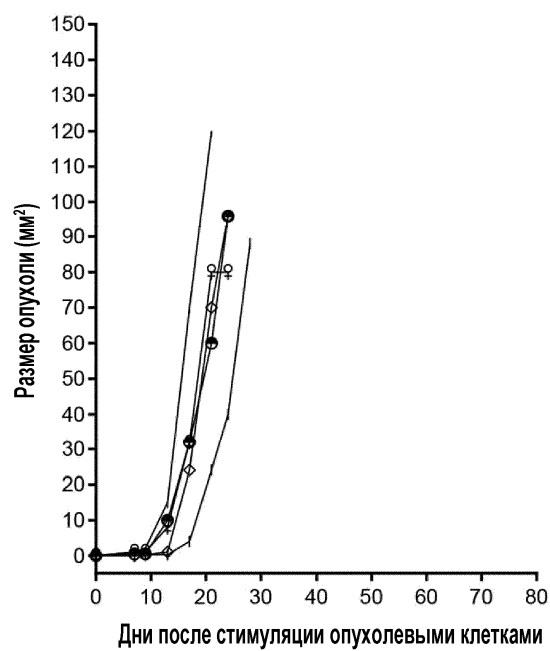
Фиг. 6А



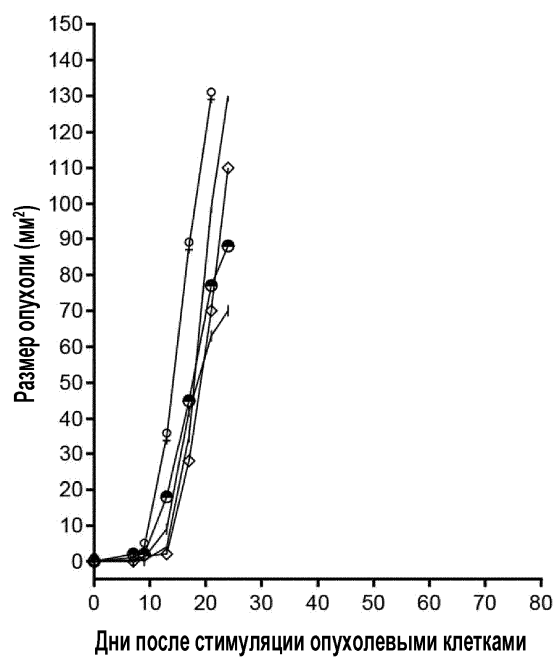
Фиг. 6В



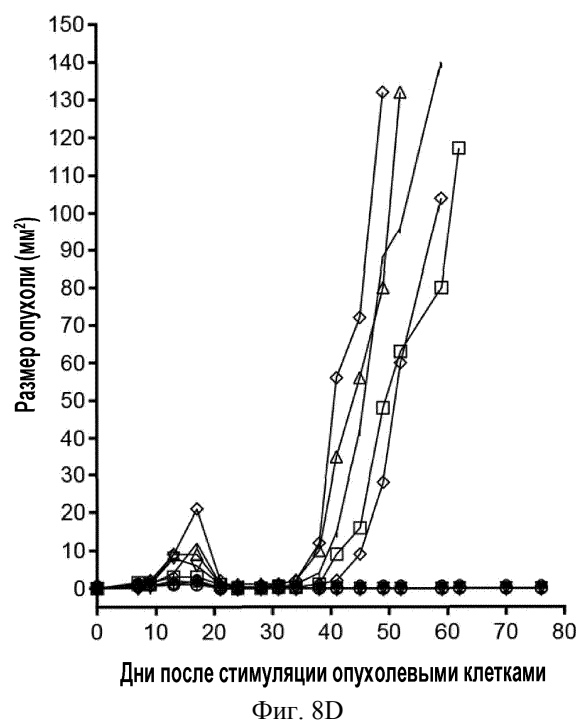
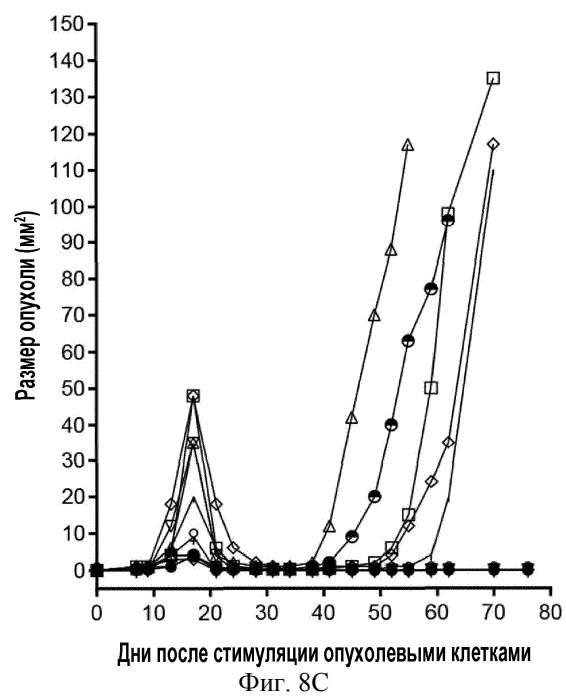
Фиг. 7

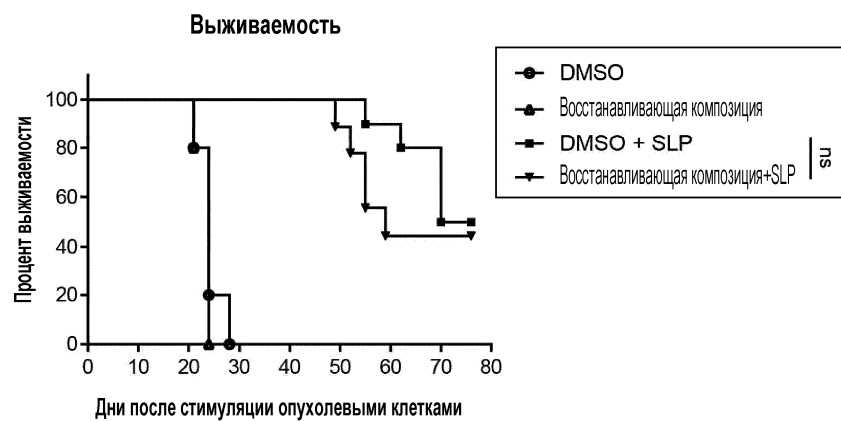


Фиг. 8А

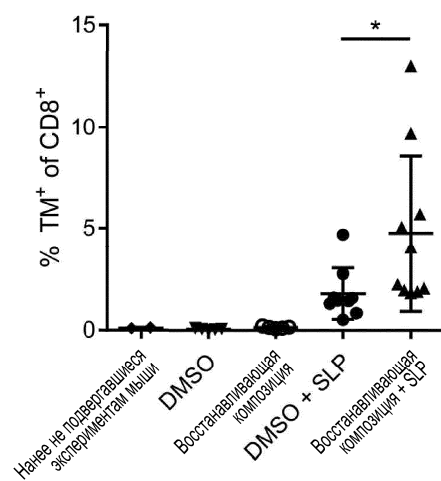


Фиг. 8В

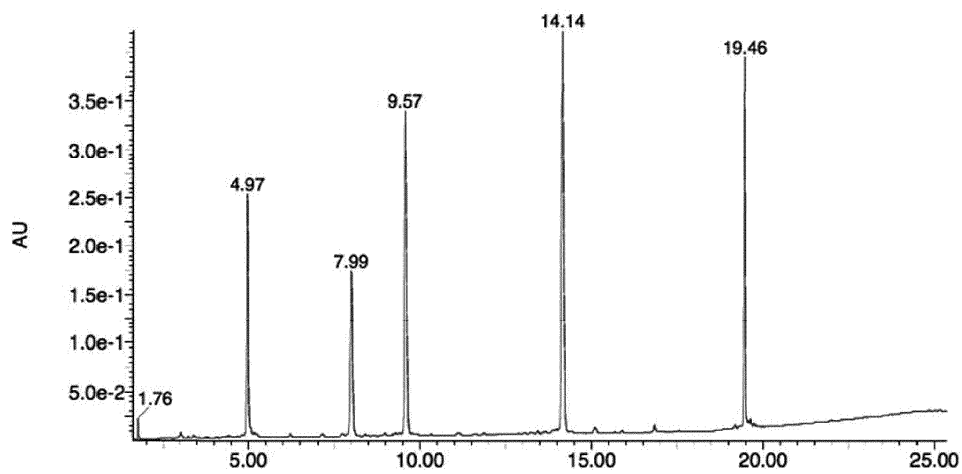




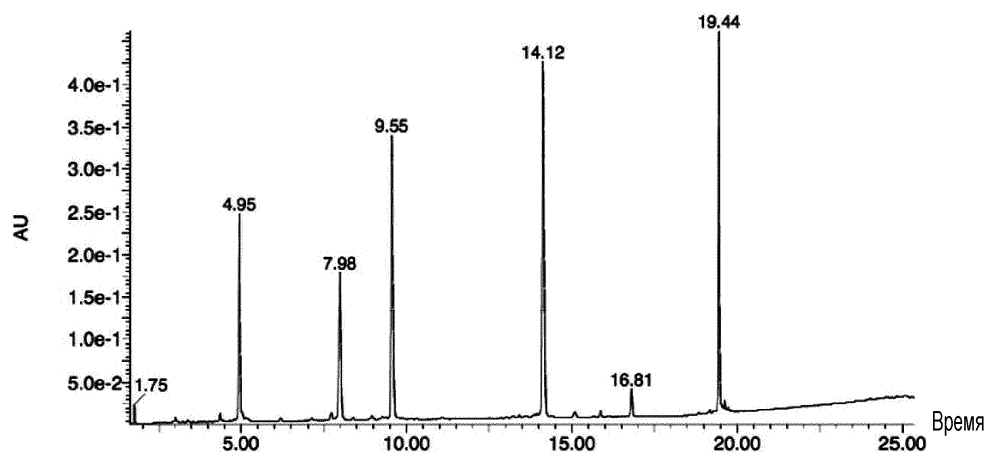
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10А



Фиг. 10В

