



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111315401 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 201880053037.7

彼得·西林

(22)申请日 2018.06.15

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务
所(普通合伙) 11413

(30)优先权数据

62/521,153 2017.06.16 US

62/627,122 2018.02.06 US

代理人 王春伟 刘继富

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.14

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/02(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/037916 2018.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/232353 EN 2018.12.20

(71)申请人 南特生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 卡伊万·尼亚兹 亚当·拉扎尔

菲利普·T·刘 安妮·申

权利要求书5页 说明书15页 附图22页

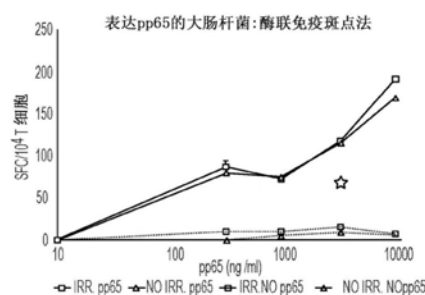
按照条约第19条修改的权利要求书5页

(54)发明名称

细菌疫苗

(57)摘要

提供了用于免疫疗法的药物组合物和方法。所述药物组合物包含表达人类疾病相关抗原,优选两种或多于两种患者特异性肿瘤抗原作为多表位的基因工程细菌。这种细菌是经过基因工程改造的脂多糖或患者自己的内共生细菌,使得该细菌以低水平表达内毒素,该水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。可将基因工程细菌全身或局部施用于患者,以诱导肿瘤特异性免疫应答。



	300ng	900ng	3mg	9mg
IRR_pp65	87	72.7	118	191.7
NO IRR_pp65	79.7	75	115.7	169
IRR_NO_pp65	9.7	9.7	15	7.3
NO IRR_NOpp65	-	5.3	9.3	8

1. 一种药物组合物,其包含:
表达疾病相关抗原的基因工程细菌,其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
5. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
6. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。
10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。
11. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。
12. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细菌为大肠杆菌。
13. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。
14. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。
15. 一种用于治疗患者的药物组合物,其包含:
患者的内共生细菌,其中细菌经基因工程改造以表达患者的疾病相关抗原。
16. 根据权利要求15所述的组合物,其中内共生细菌被进一步基因修饰以具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。
17. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。
18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
19. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
20. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。
21. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。
22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。
23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。
24. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。
25. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

26. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述内共生细菌是大肠杆菌。
27. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。
28. 一种生成用于免疫疗法的基因工程细菌的方法,其包括:
鉴定疾病相关抗原;
生成重组核酸以包含编码抗原的核酸序列;
用重组核酸转化细菌以生成表达抗原的基因工程细菌;并且
其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。
29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。
30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。
31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
33. 根据权利要求30所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。
34. 根据权利要求28所述的方法,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。
35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。
36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。
37. 根据权利要求28所述的方法,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。
38. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。
39. 根据权利要求28所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌。
40. 根据权利要求28所述的方法,其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。
41. 根据权利要求28所述的方法,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。
42. 根据权利要求28所述的方法,其中所述重组核酸包含诱导型启动子。
43. 根据权利要求28所述的方法,其还包括辐射基因工程细菌。
44. 一种生成用于患者免疫疗法的基因工程细菌的方法,其包括:
鉴定疾病相关抗原;
生成重组核酸以包含编码抗原的核酸序列;和
用重组核酸转化患者的内共生细菌以生成表达抗原的基因工程细菌。
45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。
46. 根据权利要求44所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。
47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
49. 根据权利要求46所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特

异性抗原。

50. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

53. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

54. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

55. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述内共生细菌是大肠杆菌。

56. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

57. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

58. 根据权利要求44所述的方法, 其还包括辐射基因工程细菌。

59. 一种使用免疫疗法治疗患者的方法, 其包括:

鉴定疾病相关抗原;

生成重组核酸以包含编码疾病相关抗原的核酸序列;

生成选自基因工程细菌、基因工程酵母和基因工程病毒的至少两种不同的基因工程实体, 以包含重组核酸;

通过施用基因工程细菌在患者中诱导第一免疫应答; 和

通过施用基因工程酵母或基因工程实体在患者中诱导第二免疫应答。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

61. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

63. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

64. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

65. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述重组核酸包含编码另一种疾病相关抗原的另一种核酸序列。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

68. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

69. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

70. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述细菌为大肠杆菌。

71. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

72. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和

编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

73. 根据权利要求59所述的方法,其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

74. 根据权利要求59所述的方法,其还包括在施用前辐射基因工程细菌。

75. 根据权利要求59所述的方法,其还包括共同施用共刺激分子和检查点抑制剂。

76. 根据权利要求59所述的方法,其中第一基因工程实体是基因工程细菌,第二基因工程实体是基因工程酵母。

77. 根据权利要求59所述的方法,其中第二基因工程实体是基因工程酵母。

78. 根据权利要求59所述的方法,其中第二基因工程实体是基因工程病毒。

79. 根据权利要求59所述的方法,其中以两种不同途径施用第一基因工程实体和第二基因工程实体,其中两种不同途径选自皮下注射、静脉内注射、肿瘤内注射、肌肉注射、皮内注射、脑内注射、脑室内注射、口服施用、局部施用、吸入、舌下施用和经黏膜施用。

80. 根据权利要求59所述的方法,其中施用第一基因工程实体是初次施用,施用第二基因工程实体是加强施用。

81. 一种使用免疫疗法治疗患者的方法,其包括:

鉴定疾病相关抗原;

生成重组核酸以包含编码抗原的核酸序列;

用重组核酸转化患者的细菌以生成表达抗原的基因工程细菌;和

向患者施用基因工程细菌,其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。

82. 根据权利要求81所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

83. 根据权利要求81所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

84. 根据权利要求83所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

85. 根据权利要求83所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

86. 根据权利要求83所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

87. 根据权利要求81所述的方法,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

89. 根据权利要求88所述的方法,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

90. 根据权利要求81所述的方法,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

91. 根据权利要求81所述的方法,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

92. 根据权利要求81所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌。

93. 根据权利要求81所述的方法,其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

94. 根据权利要求81所述的方法,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

95. 根据权利要求81所述的方法,其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

96. 根据权利要求81所述的方法,其还包括在施用前辐射基因工程细菌。
97. 根据权利要求81所述的方法,其还包括共同施用共刺激分子和检查点抑制剂。
98. 一种使用免疫疗法治疗患者的方法,其包括:
鉴定疾病相关抗原;
生成重组核酸以包含编码抗原的核酸序列;
用重组核酸转化患者的内共生细菌以生成表达抗原的基因工程细菌;和
向患者施用基因工程细菌。
99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。
100. 根据权利要求98所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。
101. 根据权利要求100所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
102. 根据权利要求100所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
103. 根据权利要求100所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。
104. 根据权利要求98所述的方法,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。
105. 根据权利要求104所述的方法,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。
106. 根据权利要求105所述的方法,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。
107. 根据权利要求98所述的方法,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。
108. 根据权利要求98所述的方法,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。
109. 根据权利要求98所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌。
110. 根据权利要求98所述的方法,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。
111. 根据权利要求98所述的方法,其中所述重组核酸包含诱导型启动子。
112. 根据权利要求98所述的方法,其还包括在施用前辐射基因工程细菌。
113. 根据权利要求98所述的方法,其还包括共同施用共刺激分子和检查点抑制剂。
114. 根据权利要求1至27所述的药物组合物在使用免疫疗法治疗患者中的用途。
115. 根据权利要求1至27所述的药物组合物在制备细菌疫苗中的用途。

细菌疫苗

[0001] 本申请要求2017年6月16日提交的序列号62/521153和2018年2月6日提交的序列号62/627122的共同待定的美国临时申请的优先权。

发明领域

[0002] 本发明的领域是制备和/或使用基因修饰的细菌进行免疫治疗的组合物和方法。

[0003] 发明背景

[0004] 背景描述包括有助于理解本发明的信息。并不意味着承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明有关,或者承认明确或隐含引用的任何出版物为现有技术。

[0005] 使用在体内引起针对癌细胞的免疫应答的抗原的免疫疗法对于癌症是有吸引力的治疗选择,因为它为提供包括可定制的疫苗和其他治疗剂的患者特异性和/或癌症特异性的治疗打开了大门。在这种类型的治疗方法中,源自患者癌细胞的抗原(例如,包含一个或多个突变的短肽等)被递送至免疫细胞,以与主要的组织相容性复合物(MHC)结合并呈递,以引发或增强患者自身的免疫应答。在PCT/US16/56550中教导了用于与特定的MHC类型结合的抗原鉴定和靶向抗原的实例,其全部内容并入本文。

[0006] 本文所有的出版物和专利申请都通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请均被具体地和单独地指出通过引用并入一样。当在并入的参考文献中术语的定义或使用与本文提供的术语的定义不一致或相反时,适用本文提供的该术语的定义,而不适用参考文献中该术语的定义。

[0007] 基因修饰的病毒(例如,腺病毒、其他非病原性病毒,包括基因修饰的HSV等)由于其相对较高的基因递送效率(例如,高感染率)而成为体内免疫细胞的优选抗原递送载体。然而,使用病毒作为递送载体会给免疫治疗带来一些限制。首先,包括腺病毒在内的许多病毒的包装能力受到限制,以致使用此类病毒大规模制备多种抗原的效率低下。另外,制备足以引起免疫应答的数量的基因修饰的病毒花费相对较长的时间(例如一个月或超过一个月),使得肿瘤生长的早期干预或使用免疫疗法的紧急治疗可能是不可行的。

[0008] 已经提出其他微生物例如酵母或细菌作为癌症抗原的候选递送载体。例如,US 8734778公开了表达癌胚抗原的酵母,并将该酵母施用至患有甲状腺癌的患者。

[0009] US 2016/0317634公开了减毒突变的沙门氏菌菌株用于递送编码间皮素的重组DNA分子的用途。然而,使用基因修饰的细菌可能会导致患者由于这种生物体产生的各种内毒素而产生严重的免疫应答。

[0010] 因此,尽管本领域已知用于各种癌症的免疫疗法的各种系统和方法,但是它们的全部或几乎全部都存在若干缺点。最为明显的是,鉴于许多癌症中的新抗原相对较多并且需要使用免疫疗法早期干预癌症的生长,仍然需要以患者良好耐受的方式在体内表达和递送患者特异性和/或癌症特异性抗原的用于基因修饰的生物的组合物和方法。

发明内容

[0011] 本发明的主题涉及免疫疗法的各种组合物和方法,其中具有降低的内毒素含量的基因工程细菌或患者自身的内共生细菌可用于表达和递送患者特异性和/或癌症特异性抗原,以引发或增强患者对癌细胞的免疫应答,同时不会引起内毒素性休克反应。

[0012] 因此,在本发明主题的一个方面,发明人预期了一种药物组合物,其包含表达人或哺乳动物疾病相关抗原的基因工程细菌。尽管可以使用多种类型的细菌,但优选的是,基因工程细菌是大肠杆菌(*Escherichia coli.*)的菌株。基因工程细菌也通过基因工程化使得其表达内毒素处于通常不足以在患者体内诱导CD-14介导的脓毒症水平。在本发明主题的另一方面,本发明人还预期了一种用于治疗患者的药物组合物,其包含患者的内共生细菌,该内共生细菌经基因工程化以表达患者的疾病相关的抗原。

[0013] 最典型地,在两种基因工程细菌中,人或哺乳动物疾病相关抗原是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原,并且优选地也是患者特异性抗原。因此,在一个优选的实施方案中,人或哺乳动物疾病相关抗原是通过分析患者的组学数据鉴定的患者特异性的新抗原(“新表位”)。预期了新抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。在这种情况下,还预期了抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

[0014] 在其他实施方案中,基因工程细菌表达两种或多于两种人或哺乳动物疾病相关抗原。在这些实施方案中,预期了两种或多于两种抗原被表达为多表位,优选地在它们之间具有肽间隔区。此外,重组细菌还可以表达共刺激分子和检查点抑制剂中的至少一种。

[0015] 在本发明主题的又一个方面,发明人预期了一种用于免疫疗法的基因工程细菌的制备方法,该方法包括鉴定人或哺乳动物疾病相关抗原的步骤。利用鉴定出的人或哺乳动物疾病相关抗原,构建重组核酸以包括编码该抗原的核酸序列。然后,用重组核酸转化细菌以产生表达抗原的基因工程细菌。尽管可以使用多种类型的细菌,但优选的是,基因工程细菌是大肠杆菌的菌株。在该实施方案中,基因工程细菌还可以表达基因工程脂多糖,使得其以低水平表达内毒素,该水平优选不足以在患者中诱导CD-14介导的脓毒症反应。或者,基因工程细菌衍生自选自患者微生物区系的患者的内共生细菌。

[0016] 最典型地,在两种基因工程细菌中,人或哺乳动物疾病相关抗原是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原,并且优选地也是患者特异性抗原。在一个优选的实施方案中,人或哺乳动物疾病相关抗原是通过分析患者的组学数据鉴定的患者特异性的新抗原。预期新抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。在这种情况下,还预期抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

[0017] 在其他实施方案中,基因工程细菌表达两种或多于两种人或哺乳动物疾病相关抗原。在这些实施方案中,预期两种或多于两种抗原被表达为多表位,其间具有肽间隔区。另外,重组核苷酸序列还可以包括编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。此外,优选的是,重组核苷酸序列包括用于蛋白质表达的诱导型启动子,使得可以在最佳时间点调节抗原和/或共刺激分子或检查点抑制剂的表达。

[0018] 另外,发明人预期可以对基因工程细菌进行辐射(例如,电子束辐射、 γ 辐射、UV辐射等),以便杀死细菌并使之灭活。

[0019] 在本发明主题的又一个方面,发明人预期了使用免疫疗法治疗患者的方法,该方法包括鉴定人或哺乳动物疾病相关抗原的步骤。利用鉴定出的疾病相关抗原,构建重组核酸以包括编码该抗原的核酸序列。最典型地,人或哺乳动物疾病相关抗原是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原,并且优选地也是患者特异性抗原。在一个优选的实施方案中,疾病相关抗原是通过分析患者的组学数据鉴定的患者特异性的新抗原。预期新抗原是患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。在这种情况下,还预期抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

[0020] 所预期的方法还提供了在至少两个不同时间点引发至少两个单独的免疫应答的工具。因此,产生选自基因工程细菌、基因工程酵母和基因工程病毒的至少两种不同的基因工程实体,以包含重组核酸。然后,通过在第一时间点施用第一基因工程实体来诱导患者中的第一免疫应答,并且通过在第二时间点施用第二基因工程实体来在患者中诱导第二免疫应答。

[0021] 预期了选择遗传工程实体中的第一实体和第二实体,使得第一实体比第二实体更快地表达和/或产生抗原。因此,在一些实施方案中,第一基因工程实体是细菌,第二实体是酵母。在其他实施方案中,第一实体是细菌,第二实体是病毒。在其他实施方案中,第一实体是酵母,第二实体是病毒。

[0022] 还预期了可以通过相同途径或两条不同途径将第一基因工程实体和第二基因工程实体施用给患者。当选择两条不同的路径时,那两条不同的路径可能具有不同的速度、速率、功效和/或相关的递送(副)作用。因此,发明人预期,施用第一基因工程实体可以作为初次施用,施用第二基因工程实体可以作为加强施用。

[0023] 最典型地,在该方法中,疾病相关抗原是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原,并且优选地也是患者特异性抗原。在一个优选的实施方案中,疾病相关抗原是通过分析患者的组学数据鉴定的患者特异性的新抗原。预期新抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。在这种情况下,还预期抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

[0024] 在一些实施方案中,基因工程实体表达两种或多于两种人或哺乳动物疾病相关抗原。在这些实施方案中,预期两种或多于两种抗原被表达为多表位,其间具有肽间隔区。此外,重组实体还可以表达共刺激分子和检查点抑制剂中的至少一种。

[0025] 另外,发明人预期,当基因工程实体是细菌或酵母时,可以对基因工程细菌或酵母进行辐射(例如,电子束辐射、 γ 辐射、UV辐射等),以便杀死和灭活该细菌或酵母。在该实施方案中,基因工程细菌还表达基因工程脂多糖,使得其以低水平表达内毒素,该水平不足以在患者中诱导CD-14介导的脓毒症反应。或者,基因工程细菌还可以衍生自选自患者正常微生物区系的患者的内共生细菌。

[0026] 在本发明主题的又一个方面,发明人预期了使用免疫疗法治疗患者的方法,该方法包括鉴定人或哺乳动物疾病相关抗原的步骤。利用鉴定出的疾病相关抗原,构建重组核酸以包括编码该抗原的核酸序列。然后,用重组核酸转化细菌以产生表达抗原的基因工程细菌。尽管可以使用多种类型的细菌,但优选的是,基因工程细菌是大肠杆菌的菌株。在该实施方案中,基因工程细菌以低水平表达内毒素,优选以不足以诱导患者CD-14介导的脓毒症的水平表达内毒素。或者,基因工程细菌衍生自选自患者正常微生物区系的患者的内共

生细菌。

[0027] 最典型地,在两种基因工程细菌中,疾病相关抗原是肿瘤抗原或肿瘤相关抗原,并且优选地也是患者特异性抗原。在一个优选的实施方案中,疾病相关抗原是通过分析患者的组学数据鉴定的患者特异性的新抗原。预期新抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。在这种情况下,还预期抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

[0028] 在其他实施方案中,基因工程细菌表达两种或多于两种疾病相关抗原。在这些实施方案中,预期两种或多于两种抗原被表达为多表位,其间具有肽间隔区。此外,重组细菌还可以表达共刺激分子和检查点抑制剂中的至少一种。此外,优选的是,重组核苷酸序列包括用于蛋白质表达的诱导型启动子,使得可以在最佳时间点调节抗原和/或共刺激分子或检查点抑制剂的表达。另外,发明人预期可以对基因工程细菌进行辐射(例如,电子束辐射、 γ 辐射、UV辐射等),以便杀死和/或灭活细菌。

[0029] 在本发明主题的又一个方面,本发明人预期了上述药物组合物在使用免疫疗法治疗患者中的用途。另外,发明人还预期了上述药物组合物在制备细菌疫苗中的用途。

[0030] 通过以下对优选实施方案的详细描述以及附图,本发明主题的各种目的、特征、方面和优点将变得更加明显,在附图中,相同的附图标记表示相同的组件。

[0031] 附图简要说明

[0032] 图1说明了免疫应答的每个步骤中的免疫应答级联和细胞因子的类型。

[0033] 图2是说明通过门控珠(gated bead)系统和方法检测细胞因子释放的特异性的图。

[0034] 图3是显示基因修饰的细菌中PP65的诱导表达的代表性数据。

[0035] 图4是显示PP65在LPS缺陷的BL21细胞系中的诱导表达的代表性数据。

[0036] 图5A示出了在有或没有树突细胞的T细胞中细胞因子释放的标准化热图。

[0037] 图5B示出了在仅具有树突细胞的情况下细胞因子释放的标准化热图。

[0038] 图6示出了通过暴露于辐射的细菌和活细菌来表示IL-4和IL-5释放的未标准化的T细胞测定的图。

[0039] 图7示出了通过暴露于辐射的细菌和活细菌来表示IL-13和TNF- α 释放的未标准化的T细胞测定的图。

[0040] 图8示出了通过暴露于辐射的细菌和活细菌来表示IL-6、IL-8和TNF- α 释放的未标准化的T细胞测定的图。

[0041] 图9A至图9B示出了代表基因修饰的细菌中PP65表达水平与斑点形成细胞数量之间关系的图和数据表。星号表示PP65蛋白添加(3 μ g/ml)。图9B描述了新鲜或冷冻形式的pp65的结果。

[0042] 图10A至图10E是比较暴露于LPS⁺和LPS⁻BL21细胞的所选细胞群中所选细胞因子水平的图。

[0043] 图11是描述HEK-Blue TLR5细胞中的TLR5对重组表达的鞭毛蛋白的应答的图。

[0044] 图12描述了来自各种ELISPOT测定的示例性结果。

[0045] 图13是使用针对黑色素瘤的细菌疫苗的体内模型系统的示例性说明。

具体实施方式

[0046] 发明人发现了多种免疫疗法的组合物和方法,其中基因工程细菌或其部分可以用作载体,以将一种或多于一种优选的患者特异性和癌症特异性的抗原递送至宿主,以产生针对该抗原的治疗效果,而不会引起例如对基因工程细菌的急性炎症性内毒素反应或CD14介导的脓毒症休克等不良反应。最典型地,期望的治疗效果是针对重组抗原的保护性免疫应答。

[0047] 因此,发明人特别预期了药物组合物,其将包括组成或诱导表达人或哺乳动物疾病相关抗原的基因工程细菌。最典型地,基因工程细菌具有一种或多于一种影响LPS(脂多糖、内毒素)合成的突变,使得在施用基因工程细菌后,基因工程细菌将不再触发急性炎症性内毒素反应或CD14介导的脓毒症休克。或者,合适的基因工程细菌还可以包括各种人内共生细菌,它们可以经过或可以不经过如上所述的基因修饰。优选地,在使用人内共生细菌的情况下,只会对其进行修饰以表达一种或多于一种所需抗原,并且通常会将它们重新引入隔离它们的体腔(例如牙周袋、喉咙、胃、结肠等)。

[0048] 因此,发明人还预期了药物组合物可以以疫苗形式(在对患者进行癌症治疗之前、期间或之后等)用作免疫疗法。当然,应当认识到,可以通过靶向相同和/或附加抗原的附加疫苗组合物例如酵母或病毒疫苗组合物来进一步辅助免疫疗法。无论表达方式如何,都可以对基因工程细菌进行辐射或导致其复制缺陷或被杀死(例如热灭活、超声处理等)。

[0049] 在一个优选的实施方案中,人或哺乳动物疾病相关抗原是肿瘤抗原。如本文所使用的,肿瘤抗原是肿瘤细胞在体外或体内产生的任何抗原性物质。肿瘤抗原包括仅在特定肿瘤细胞中特异性表达的肿瘤特异性抗原、以及在许多不同肿瘤细胞中表达的肿瘤相关抗原。预期了这些肿瘤抗原中的许多抗原源自可能导致蛋白质异常结构(例如,无义、错义、移码等)的遗传突变(例如,缺失、插入、颠换、转换、易位等)或源自蛋白质的表观遗传变化(例如,过表达、失活等)。

[0050] 更优选地,人或哺乳动物疾病相关的抗原是患者特异性和肿瘤特异性的新抗原,该新抗原是通过分析和比较来自患者患病组织和健康组织的组学数据来鉴定的(例如,通过全基因组测序和/或外显子组测序等)。在鉴定出的突变中,通常优选通过用突变类型、转录强度、翻译强度和先验已知分子变异中的至少一种过滤来进一步选择患者特异性的新抗原。关于鉴定患者特异性的新抗原和/或癌症特异性、患者特异性的新抗原的进一步细节在国际专利申请第PCT/US16/56550号中有详细描述,该专利申请全文并入本文。

[0051] 此外,特别预期的是,疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合物,可以使用例如在WO 2017/035392中描述的de Bruijn图方法或使用本领域已知的常规方法(例如,基于抗体的方法)通过计算机确定。通过计算机测试疾病相关抗原针对确定的HLA类型的结合亲和力。优选的结合亲和力可以例如使用NetMHC通过最低 K_D 来测量,最低 K_D 例如小于500nM、或小于250nM、或小于150nM、或小于50nM。最典型地,HLA类型的确定包括至少三种MHC-I亚型(例如HLA-A、HLA-B、HLA-C等)和至少三种MHC-II亚型(例如HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR等),优选确定每个亚型至至少4位深度。应当意识到,这样的方法不仅将鉴定出真正对患者和肿瘤特异性的新抗原,而且还将鉴定出最有可能呈现在细胞上并且因此最有可能引发具有治疗作用的免疫应答的那些新抗原。

[0052] 当然,应当意识到,可以使用NetMHC以外的系统将患者的HLA类型与患者特异性和

癌症特异性的新抗原进行匹配,合适的系统包括NetMHC II、NetMHCpan、IEDBAnalysis Resource (URLimmunepitope.org)、RankPep、PREDEP、SVMHC、Epipredict、HLABinding等(参见例如J Immunol Methods2011;374:1-4)。在计算最高亲和力时,应当注意的是,可以使用改变了氨基酸位置的新抗原序列的集合(同上)。可替代地或另外地,可以通过添加N末端修饰和/或C末端修饰来实现对新抗原的修饰,以进一步增加表达的新抗原与患者HLA型的结合。因此,新抗原可以是已鉴定的天然抗原,也可以进一步修饰以更好地匹配特定的HLA类型。

[0053] 此外,在需要的情况下,可以计算相应的野生型序列(即没有氨基酸改变的新抗原序列)的结合,以确保高的差异亲和力。例如,特别优选在新抗原及其相应的野生型序列之间的MHC结合中的高差异亲和力为至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍等。

[0054] 然后将编码鉴定出的疾病相关抗原的核苷酸序列插入盒中,并克隆到具有特定启动子(例如细菌特异性启动子、酵母特异性启动子、病毒特异性启动子等)的载体中,从而使其可以在微生物(例如细菌、酵母等)或病毒中表达。尽管可以使用用于表达蛋白质的任何合适的载体,但优选的是可以携带至少1k、优选2k、更优选5k碱基对的盒大小的载体。最优选地,预期了可以被亚克隆到不同载体中的盒,从而促进携带相同盒的不同重组实体的产生。例如,在患者的组学分析显示了一定数量的合适(新)抗原的情况下,可以构建重组序列盒,该盒编码没有合适调控元件(例如启动子、5'-UTR、3'-UTE、polyA)的(新)抗原,因为这种调控元件可以由各个表达系统的各个表达载体(例如细菌、酵母、病毒)提供。

[0055] 在一些实施方案中,核苷酸盒包括在同一启动子下游的两个或多于两个疾病相关抗原的核苷酸序列,以编码多表位抗原。如本文所使用的,多表位指表达为单个多肽的两个或多于两个抗原的串联排列。优选地,两个或多于两个与疾病相关的抗原被接头或间隔肽隔开。可以使用任何合适的长度和顺序的接头或间隔区的肽序列。然而,优选接头的长度为3个至30个氨基酸,优选5个至20个氨基酸,更优选5个至15个氨基酸。发明人还预期优选富含甘氨酸的序列(例如,gly-gly-ser-gly-gly等)以提供两种抗原之间的多表位的柔性。

[0056] 两种或多于两种疾病相关的抗原优选是针对相同的MHC亚型(例如,I类MHC亚型或II类MHC亚型)的高亲和力结合剂。因此,在这些实施方案中,盒可包含针对I类MHC亚型或II类MHC亚型呈递的抗原运输信号的核苷酸序列。在最优选的方面,信号肽可用于将新抗原运输至内体和溶酶体区室(并指导新抗原呈递给MHC-II),或用于保留在细胞质空间中(并指导新抗原呈递给MHC-I)。例如,其中在肽被输出到内体和溶酶体区室靶向前序列,并且可以使用内部靶向肽。

[0057] 优选将靶向肽的前序列添加至N端,并包含6个至136个碱性和疏水性氨基酸。在过氧化物酶体靶向的情况下,靶向序列可以在C末端。可以使用其他信号(例如信号补丁),并且其他信号包括在肽序列中分离并在适当的肽折叠后起作用的序列元件。另外,如糖基化的蛋白质修饰可以诱导靶向。在其他合适的靶向信号中,发明人预期了过氧化物酶体靶向信号1(PTS1)、C端三肽和过氧化物酶体靶向信号2(PTS2),其是位于N末端附近的九肽。另外,还可以通过蛋白质的胞质结构域内的信号来介导蛋白质向内体和溶酶体的分类,所述蛋白质的胞质结构域通常包含短的线性序列。一些信号被称为基于酪氨酸的分选信号,并且符合NPXY或YXX0共用基序。称为基于双亮氨酸的信号的其他信号也适合[DE]XXXL[LI]或

DXXLL共用基序。所有这些信号都被与膜的胞质表面外围相关的蛋白质外壳的成分所识别。衔接蛋白 (AP) 复合物AP-1、AP-2、AP-3和AP-4以特征性的精细特异性识别YXX0和[DE]XXXL[LI]信号,而DXXLL信号被另一个称为GGA的衔接子家族识别。还可以添加FYVE结构域,该结构域与液泡蛋白分选和内体功能有关。在其他方面,也可以使用人CD1尾部序列来靶向内体区室(参见例如Immunology,122,522-531)。

[0058] 转运至或保留在胞质区室中不一定需要一种或多于一种特定的序列元件。然而,在至少一些方面,可以添加N端或C端细胞质保留信号,包括膜锚定蛋白或膜锚定蛋白的膜锚定域。例如,膜锚定蛋白包括SNAP-25、突触融合蛋白、小突触泡蛋白、突触结合蛋白、囊泡相关膜蛋白 (VAMP)、突触囊泡糖蛋白 (SV2)、高亲和力胆碱转运体、神经连接蛋白、电压门控钙通道、乙酰胆碱酯酶和NOTCH。

[0059] 在本发明主题的进一步预期的方面,本发明人还预期了重组核酸可以编码其他非患者抗原以额外增强免疫应答。或者,也可以在细菌基因组中编码非患者抗原。最优选地,额外的蛋白质将包括各种TLR和/或NOD配体。例如,用于TLR2受体的各种肽聚糖和脂蛋白、用于TLR5受体的鞭毛蛋白等。

[0060] 发明人发现,细菌可以用作在体内表达疾病相关抗原的快速和方便的媒介物,以局部或全身地引发免疫应答。一种优选的细菌是大肠杆菌 (E.coli),因为其快速的生长(例如20分钟内完成一个完整的细胞周期),并且可获得许多针对诱导后蛋白质过表达而优化的菌株(例如用IPTG诱导lac启动子等)。然而,已经预期到大多数细菌菌株不适合体内施用(例如,注射、引入血液、或植入器官或组织),因为几乎所有细菌通常都表达脂多糖,这些脂多糖引发重大的免疫应答并引起内毒素反应,从而可能导致患者致命的脓毒症(例如CD-14介导的脓毒症)。因此,特别优选的菌株是基于基因修饰的细菌,其表达内毒素的水平足够低,当引入人体时不会引起急性炎症性内毒素反应或CD14介导的脓毒症休克。例如,可以通过主观反应(包括发冷、肌肉疼痛、头痛、恶心和/或光敏性)以及各种可量化的数据(例如心率增加、体温升高、收缩压下降)来识别急性炎症性内毒素反应。然而,最典型地,急性炎症性内毒素反应或CD14介导的脓毒症休克病可以通过ELISA或其他测定各种细胞因子和趋化因子特别是IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、GRO- α 、MIP-2和CXCL1的测试来确定(另参见Blood.1996Jun15;87(12):5051-60;or Clin Diagn Lab Immunol.2005Jan;12(1):60-67)。

[0061] 从不同的角度来看,优选的基因修饰的细菌将具有至少一个修饰或缺失的基因,该基因编码脂多糖或其前体的生物合成所需的蛋白质。其中,用于缺失或修饰的合适基因包括本领域报道的那些基因(例如,PLoS ONE10(4):e0121216;或Annu Rev Biochem 2014,卷83:99-128;或Annu Rev Biochem.2002;71:635-700)。

[0062] 例如,一种具有修饰的脂多糖的示例性细菌菌株是可商购获得的菌株 **ClearColi®** BL21 (DE3) 电转感受态细胞。该细菌菌株为BL21,基因型为F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm lon λ (DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1ind1 sam7nin5])msbA148 AgutQ AkdsD AlpxLAlpxMApagPAIpxP AeptA。在这种情况下,应当意识到几种特定的缺失突变(AgutQ AkdsD AlpxL AlpxMApagPAIpxPAeptA)编码将LPS修饰为脂质IVA所需的蛋白质,而另一种补偿性突变(msbA148)使细胞在LPS前体脂质IVA存在的情况下仍能保持活力。这些突变导致LPS中寡糖链的缺失。更具体地,六个酰基链中的两个被删除。LPS的六个酰基链

是引发剂,其被Toll样受体4 (TLR4) 与髓样分化因子2 (MD-2) 的复合体识别,从而引起NF- κ B的活化和促炎细胞因子的产生。TLR4无法识别仅包含四个酰基链的脂质IVA,因此不会触发内毒素反应。尽管以电转感受态BL21细菌为例,但发明人认为,基因修饰的细菌也可以是化学感受态细菌。

[0063] 在又一个实例中,还通过lpxL基因的突变(在其他情况下为缺失)修饰了大肠杆菌菌株,这产生了明显简化的大肠杆菌菌株,其明显缺乏上述可商购获得的LPS缺陷菌株的炎性特征。当然,应当意识到修饰可以通过点突变、缺失、插入、反义RNA的表达等来实现。因此,在其他选择中,编码脂多糖生物合成所需的一种或多于一种蛋白质的修饰或缺失的基因尤其包括gutQ基因、kdsD基因、lpxA基因、lpxL基因、lpxM基因、pagP基因、lpxP基因和eptA基因。在W098/53851、US8303964、US7011836和US2005/0106184中描述了用于产生LPS减少的或无LPS的革兰氏阴性细菌的其他合适的方案和方法。

[0064] 另外,发明人还预期,患者自身的内共生细菌可以用作在体内表达疾病相关抗原的载体,以至至少局部引发免疫应答。如本文所使用的,患者的内共生细菌指存在于患者体内的细菌,而与患者的健康状况无关,没有引起任何实质性的免疫应答。因此,可以预期患者的内共生细菌是患者的正常菌群。例如,患者的内共生细菌可能包括大肠杆菌、乳杆菌(Lactobacillus)、丙酸杆菌(Propionibacterium)和链球菌(Streptococcus),它们常见于人的皮肤、牙周袋、肠或胃中。在这些实施方案中,患者自身的内共生细菌可以从患者的活检样本中获得,该活检样本来自肠、胃、口腔黏膜或结膜的一部分、或来自粪便样本中。然后可以在体外培养患者的内共生细菌,并用编码疾病相关抗原的核苷酸转染。

[0065] 因此,应该意识到在本文提出的方法中使用的细菌可以来自产生LPS的菌株,或者经过基因工程化以减少或消除一种或多于一种酶的表达,从而导致形成被TLR特别是TLR4识别的LPS。最典型地,将对这些细菌进行基因修饰以通过可诱导的方式来表达至少一种与疾病相关的抗原以用于免疫疗法。在其他选择中,诱导表达可以使用哺乳动物中不常见的合成化合物(例如IPTG、经取代的苯、环己酮相关化合物)或哺乳动物中天然存在的化合物(例如糖(包括1-阿拉伯糖、1-鼠李糖、木糖和蔗糖)、 ϵ -己内酰胺、丙酸酯或肽)来完成,或者可以在一种或多于一种环境因素(例如温度或氧敏感性启动子)的控制下进行诱导。

[0066] 本发明主题的另一方面包括产生表达疾病相关抗原的基因工程细菌用于免疫疗法的方法。通常,该方法以如上所述的鉴定疾病相关抗原的步骤开始。优选地,疾病相关抗原是肿瘤抗原(肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原),更优选患者特异性肿瘤新抗原。确定了与疾病相关的抗原后,可以将编码已鉴定的与疾病相关的抗原的核苷酸序列插入盒中,并克隆到在细菌中表达的具有特异性启动子(例如,诱导型启动子等)的载体中。然后将核苷酸序列转染到基因修饰的细菌(例如, **ClearColi®** BL21 (DE3) 电转感受态细胞、或所表达的内毒素水平在引入人体后不足以诱导CD-14介导的脓毒症的任何其他类型的感受态细菌)或患者自身的内共生细菌中,该细菌在进行如上所述的转化之前可以任选地在体外培养。

[0067] 另外,应当意识到,尽管通常优选表达抗原的整个细菌细胞,但是也认为崩解的细菌或其部分是合适的。例如,在培养重组细菌后,预期细菌可经历将细胞片段化的崩解方案。例如,合适的方案包括渗透、酶促、化学和/或物理崩解,例如超声处理、渗透震扰、法式压裂解、基于溶剂的裂解等。尽管在一些实施方案中,裂解物的全部用于疫苗制剂,但是还

预期了可以进一步处理裂解物以除去一种或多于一种组分。例如,裂解物可以用有机溶剂萃取以除去一种或多于一种亲脂性组分,通过分子筛除去或分离分子量阈值以上或以下的组分等。如果需要,还可以对(加工过的)裂解物进行处理以除去水,例如通过冻干、喷雾干燥等。

[0068] 如也将容易理解的,重组细菌或其部分可以与其他抗原组合,所述其他抗原可以与细胞中表达的那些相同或不同。同样地,可以将额外的TLR和/或NOD配体以及免疫刺激性细胞因子或类似物(例如ALT-803)加入重组细菌或其部分中,以进一步提高免疫刺激作用。

[0069] 因此,发明人预期,表达一种或多于一种疾病相关抗原的基因工程细菌(或其部分)可通过将基因工程细菌施用于人体而用于免疫疗法。总的来说,基因工程细菌涉及1)表达修饰的脂多糖的基因工程细菌(其表达的内毒素水平足够低,以至于不会在人体细胞中引起内毒素反应,或者在引入人体时不足以诱导CD-14介导的脓毒症),和2)如上所述的患者自身的内共生细菌。因此,另一发明主题包括使用免疫疗法治疗患者的方法,所述免疫疗法使用表达一种或多于一种疾病相关抗原的基因工程细菌。该方法以如上所述的鉴定疾病相关抗原的步骤开始。优选地,人类疾病相关抗原是肿瘤抗原(肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原),更优选患者特异性肿瘤新抗原。确定了与疾病相关的抗原后,可以将编码经鉴定的与疾病相关的抗原的核苷酸序列插入盒中,并克隆到在细菌中表达的具有特异性启动子(例如,诱导型启动子等)的载体中。然后将核苷酸序列转化为基因修饰的细菌(例如, **ClearColi®** BL21 (DE3) 电转感受态细胞,或所表达的低内毒素水平在引入人体后不足以诱导CD-14介导的脓毒症的其他类型的感受态细菌)或患者自身的内共生细菌中,该细菌在进行如上所述的转化之前可以任选地在体外培养。

[0070] 然后将基因工程细菌施用于患者。取决于施用目的,可以使用任何合适的施用方法。例如,可以将基因工程细菌施用于患者以局部诱导免疫应答。然后,可以通过局部注射来施用细菌,所述局部注射包括但不限于肿瘤内注射、肌肉注射、皮内注射、脑内注射和脑室内注射。而且,可以通过局部应用包括局部施用、吸入、舌下施用或经黏膜施用来施用细菌。再例如,可以将基因工程细菌施用于患者以诱导全身免疫应答。在这种情况下,可以通过皮下注射或静脉内注射来施用细菌。

[0071] 在一些实施方案中,为了防止微生物过度生长和/或由细菌本身引起的潜在副作用或毒性,可以在向患者施用之前对基因工程细菌进行辐射。可以使用任何合适的辐射方法,例如,使用 γ 射线、X射线和电子束的辐射。任选地,可以在辐射后进行细胞培养测试,以在向患者施用之前确认基因工程细菌的生命力。

[0072] 发明人还预期了基因工程细菌可以与其他基因工程微生物或实体结合使用。因此,本发明主题的另一方面包括使用免疫疗法治疗患者的方法,所述免疫疗法使用表达(通常相同或重叠的一组)疾病相关抗原的两个或多于两个不同的基因工程实体(例如,选自细菌、酵母和病毒)。该方法以如上所述的鉴定疾病相关抗原的步骤开始。优选地,疾病相关抗原是肿瘤抗原(肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原),更优选患者特异性肿瘤新抗原。鉴定疾病相关抗原后,可以将编码鉴定出的疾病相关抗原的核苷酸序列插入盒中,并克隆到具有特定启动子(例如细菌特异性启动子、酵母特异性启动子、病毒特异性启动子等)的载体中,从而使其可以在微生物(例如细菌、酵母等)或病毒中表达。尽管可以使用用于表达蛋白质的任何合适的载体,但优选的是可以携带至少1k、优选2k、更优选5k碱基对的盒大小的载

体。

[0073] 可以基于免疫疗法的紧迫性和两次或多于两次免疫疗法之间所需的时间来选择两个不同的基因修饰实体。预期产生基因修饰的细菌并诱导它表达疾病相关抗原通常需要几天时间,而产生基因修饰的酵母并诱导其表达疾病相关抗原通常需要1周至2周或超过1周至2周。尽管它可能取决于病毒类型,但通常需要一个月或超过一个月才能生成所需数量的基因修饰的病毒。因此,当迫切需要免疫疗法时,两个不同的基因修饰的实体优选是基因修饰的细菌和基因修饰的病毒。然而,预期两种不同的基因修饰的实体可以是基因修饰的细菌和基因修饰的酵母,也可以是基因修饰的酵母和基因修饰的病毒。在这里,总的来说,基因工程细菌涉及1)表达修饰的脂多糖的基因工程细菌,其表达的内毒素水平足够低,以至于不会在人体细胞中引起内毒素反应,或者在引入人体时不足以诱导CD-14介导的脓毒症,和2)如上所述的患者自身的内共生细菌。

[0074] 选择并产生了两个不同的基因修饰的实体后,将基因修饰的实体在不同的时间点分别施用至患者,以诱导两个不同且分开的免疫应答。例如,当两个不同的基因修饰的实体是基因修饰的细菌和基因修饰的病毒时,优选地,首先将基因修饰的细菌(第一实体)施用至患者以诱导第一免疫应答,并且首先将基因修饰的病毒(第二实体)施用至患者以诱导第二免疫应答。预期第二实体的施用在第一实体施用后至少1周,优选至少2周,更优选至少4周进行。

[0075] 在一些实施方案中,第一实体和第二实体的施用是通过两条不同的施途径进行的。可以为每个实体选择任何合适的途径。示例性的施途径包括但不限于,皮下注射、静脉内注射、肿瘤内注射、肌肉注射、皮内注射、脑内注射、脑室内注射、口服、局部施用、吸入、舌下施用和经黏膜施用。例如,当两种不同的基因修饰的实体是基因修饰的细菌和基因修饰的病毒时,可以通过全身注射(例如皮下注射、静脉内注射等)施用基因修饰的细菌,而通过吸入施用基因修饰的病毒。再例如,当两种不同的基因修饰的实体是基因修饰的细菌和基因修饰的酵母时,可以通过局部注射(例如,肿瘤内注射、肌肉注射、皮内注射、脑内注射、脑室内注射等)施用基因修饰的细菌,而可以通过口服施用基因修饰的酵母。

[0076] 尽管第一实体和第二实体的施用可以诱导两个分开的和独立的免疫应答,但是也可以预期将两个免疫应答结合以对免疫系统提供更大的作用。因此,在该实施方案中,施用第一基因工程实体是在患者体内诱导初次免疫应答的初次施用,而施用第二基因工程实体是加强施用。在此,优选在初次施用第一实体后,加强施用使免疫应答增加至少10%,优选至少30%,更优选至少50%。此外,应当注意的是,本文预期的细菌疫苗组合物可以如W01993016720中所述在碳氟化合物乳剂中施用,以减少潜在的残留急性炎症内毒素应答。

[0077] 在另外的预期方面,可以使用表达新表位的大肠杆菌或其他合适的基因修饰的细菌作为筛选,以确定患者是否具有针对表达的新表位的免疫力。通过将基因修饰的细菌添加到患者的树突细胞(APC)中,可以简单地进行这种筛选。然后将这些细胞与来自同一患者的T细胞(例如,从外周血或肿瘤浸润淋巴细胞中分离)进一步组合,然后按照下文针对p65模型系统所述的方式测量T细胞的免疫应答。如果可检测到反应性T细胞,则诱导该反应的新表位将优先用于疫苗(其可以是DNA、细菌、酵母和/或病毒疫苗)。当然,应该意识到,尽管特别优选具有减少的内毒素表达或呈递的基因工程细菌,但是重组细菌不必一定具有减少的内毒素表达或呈递。

[0078] 最后,应当注意的是,本文预期的抗原特别包括人和哺乳动物抗原。然而,许多其他抗原,例如细菌抗原和病毒抗原也被认为适用于本文。因此,特别预期了与感染、侵染或癌性疾病有关的所有抗原。

[0079] 实施例

[0080] 在将基因工程细菌施用于患者之前,可以对其进行测试以确定其在体外引发免疫应答的效率。尽管可以使用任何合适的测试,发明人仍预期了在暴露于基因工程细菌后体外测定由来自患者的免疫细胞或患者HLA匹配的树突细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞(PBMC,包括T细胞、B细胞和自然杀伤细胞(NK细胞))释放的细胞因子。如图1所示,从各种免疫细胞例如T细胞、树突细胞或其他类型的抗原呈递细胞中释放出不同种类的细胞因子,以引发进一步的免疫应答。因此,预期可以将培养的T细胞或树突细胞暴露于预定量的存活或辐射的基因工程细菌中达预定时间(例如,至少5分钟、至少10分钟、至少30分钟等)。然后,可以通过从培养的T细胞或树突细胞的容器中收集上清液来确定和定量释放的细胞因子的类型、浓度或绝对量。图2描述了一种检测方法(细胞毒素结合珠)的特异性示例,该方法可用于定量和定性检测免疫细胞释放的细胞因子。另外,可以通过评估免疫细胞死亡率或确定免疫细胞的任何形态变化来测量基因工程细菌的毒性。

[0081] 为了证明本文提出的组合物和方法的适用性,发明人使用pp65蛋白作为模型抗原,因为这种抗原通常存在于被人巨细胞病毒预先感染的大量个体中(在工业化国家中通常感染60%至70%的个体)。

[0082] 为此,发明人制备了包含lac启动子和编码作为抗原的可裂解或不可裂解的uniquitin-PP65融合蛋白的核苷酸序列的质粒构建体。pp65蛋白(65kDa低基质磷蛋白,也称为糖蛋白64或UL83)是CD4⁺以及CD8⁺T细胞对巨细胞病毒反应的免疫靶标。暴露后,pp65特异性T细胞主要产生细胞因子,例如IFN- γ 、IL-2和TNF- α 。用质粒构建体转化BL-21细菌,并通过添加异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达。除非另有说明,否则BL21细胞是经过基因修饰的可商购获得的ClearColi BL21细胞(Lucigen, 2905Parmenter St, Middleton, WI 53562)。如图3和图4所示,发明人可以成功诱导pp65抗原在BL-21细胞中的表达,如天然蛋白(图3)或可裂解或不可裂解的泛素化形式(图4)所示的约78Kda大小带(由于糖基化引起的分子量明显上移)。

[0083] 在进一步的实验中,发明人使用了表达模型抗原的基因工程细菌(人类巨细胞病毒(CMV)磷蛋白pp65(pp65)),并表明该细菌可以体外添加到人树突细胞中以激活pp65反应性T细胞。T细胞来自已知对CMV具有免疫力的人类对象。值得注意的是,与仅添加外源pp65蛋白时的应答相比,对细菌编码的蛋白的应答要强得多,这表明细菌更有效地将抗原递送到抗原加工机器中,和/或细菌通过刺激先天免疫力使抗原呈递细胞更有效。

[0084] 更具体地,使用pp65蛋白作为ClearColi BL-21细菌产生的抗原,发明人比较了暴露于表达pp65的ClearColi BL-21细菌针对免疫细胞的应答与针对单独载体(即无pp65表达)的应答或针对纯化的可溶性pp65蛋白的应答。图5A示出了表示暴露于表达pp65的细菌时T细胞的免疫应答强度的热图,图5B示出了表示暴露于表达pp65的细菌时仅树突细胞的免疫应答强度的热图。如图5A所示,暴露于可溶性pp65,与树突细胞共培养的T细胞会诱导强烈的免疫应答,从而释放IL-4、IL-5、IL-13和IFN- γ 。即使没有树突细胞,也可以通过共表达共刺激分子(CD3/CD28)观察到如此强的免疫应答。通过将T细胞暴露于表达pp-65的BL-

21细菌(暴露前辐射或活细菌),也可以诱导类似的强免疫应答。如图5B所示,仅用树突细胞无法观察到这种强烈的免疫应答,表明由表达pp-65的ClearColi BL-21细菌诱导的免疫应答是T细胞介导的应答。这些实验结果再次以定量分析的条形图显示在图6和图7(对应于图5A)和图8(对应于图5B)中。这些结果强烈表明表达疾病相关抗原的ClearColi BL-21细菌可以是携带抗原暴露于免疫细胞并引起免疫细胞抗原特异性免疫应答的有效工具。

[0085] 然后,发明人还分析了以等于预定量的可溶性pp-65蛋白的量表达pp-65的ClearColi BL-21细菌的免疫应答强度(通过细胞因子释放定量)。图9A和图9B显示表达pp-65的经辐射的或活的ClearColi BL-21细菌诱导T细胞介导的免疫应答,并且免疫应答的强度几乎与ClearColi BL-21的pp-65表达量线性相关。另外,发明人发现暴露于表达pp-65的ClearColi BL-21细菌比仅暴露于等量的可溶性pp-65(显示为星号)诱导了明显更强的免疫应答。因此,表达人类疾病相关抗原的基因工程细菌可以是一种快速、可调节的系统,以递送用于免疫识别的各种抗原。

[0086] 此外,应当意识到,可以进一步对细菌进行基因修饰,以表达一种或多于一种其他免疫调节刺激,包括各种tol1样受体配体(TLR)、细菌鞭毛蛋白(TLR5的配体)和李斯特菌溶血素O(11o)、来自李斯特氏菌的促进I类MHC肽的抗原呈递的蛋白。图12显示了将各种细胞(T细胞、PBMC)同时和单独暴露于p65和/或鞭毛蛋白的结果。

[0087] 发明人进一步研究了基因修饰的(此处为:ClearColi)细胞中缺乏LPS是否确实可以防止针对细菌中LPS成分的不利免疫应答。为此,发明人测量了暴露于LPS⁺和LPS⁻BL21-PP65产生细胞的免疫感受态细胞(Het、CD4、CD8)的各种细胞群的选定细胞因子。图10A至图10E显示了比较暴露于LPS⁺和LPS⁻BL21-PP65细胞的细胞群中所选细胞因子水平的示例性结果。在这里,使用与上述相同的抗原递送载体,并且所选细胞因子的结果显示为 μ l细菌培养物和mg/ml细菌细胞蛋白的函数。可以容易地看出,在大多数情况下,LPS⁺细胞引起明显的细胞因子反应,而LPS⁻细胞则没有或仅中等程度地引起细胞因子反应。例如,从图10D可以明显看出,IL-6(促炎性)反应明显不那么显著。然而,应当注意的是,尽管通常优选LPS⁻细胞,但LPS⁺细胞也被认为适用于本发明(例如,减少LPS产生和/或同时提供减少或消除促炎性细胞因子应答的药物(例如,新生霉素))。

[0088] 为了研究在基因修饰的细胞中表达额外的免疫刺激是否可行,本发明人使用重组表达的鞭毛蛋白作为TLR5配体的模型。HEK-Blue TLR5细胞与重组表达的鞭毛蛋白或纯鞭毛蛋白的反应如图11所示。可以清楚地看到,重组表达的鞭毛蛋白在报告细胞中引发了强烈而显著的反应。进行了在PBMC和T细胞上鞭毛蛋白和p65的共表达和单独表达的反应,并通过测量干扰素的 γ -分泌来监测反应。结果如图12所示。

[0089] 体内实施例:作为体内模型系统,发明人将使用转染了编码多核苷酸排列的已知黑色素瘤新表位的核酸的重组和减毒BL21大肠杆菌(ClearColi)。由此产生的重组细胞将用作皮下疫苗,以证实疫苗在异种移植小鼠模型中针对B16F10黑色素瘤细胞生长的保护作用,这是本领域众所周知的。接种前,B16/F10细胞在补充有10%FBS、1%PenStrep(Life Technologies 15140122)、1%L-谷氨酰胺(Life Technologies 25030081)的DMEM(Life Technologies 10313039)中生长。

[0090] 如图13所示,重组细菌疫苗的施用是在肿瘤植入前6周、4周和2周进行的。治疗将采用适当的控制,包括如上所述时间表的空白治疗和无注射。疫苗将通过皮下施用,并将使

用各种剂量,如下表更详细所示。

[0091]	组	途径	物品
	1	皮下注射	载体
	2	皮下注射	大肠杆菌 10^6 /剂量
	3	皮下注射	大肠杆菌 10^6 /剂量
	4	皮下注射	大肠杆菌 10^6 /剂量
	5	皮下注射	大肠杆菌 10^7 /剂量
	6	皮下注射	大肠杆菌 10^7 /剂量
	7	皮下注射	大肠杆菌 10^7 /剂量
	8	皮下注射	大肠杆菌 10^8 /剂量
	9	皮下注射	大肠杆菌 10^8 /剂量
	10	皮下注射	大肠杆菌 10^8 /剂量
	11	皮下注射	大肠杆菌 10^9 /剂量
	12	皮下注射	大肠杆菌 10^9 /剂量
	13	皮下注射	大肠杆菌 10^9 /剂量
	14	皮下注射	大肠杆菌 10^{10} /剂量
	15	皮下注射	大肠杆菌 10^{10} /剂量
	16	皮下注射	大肠杆菌 10^{10} /剂量

[0092] 在第41天(请参见图13),将从每个治疗组收集血液,进行Ficoll分离,如下所述在体外刺激PBMC。在第42天,将使用表中显示的细胞数向小鼠注射悬浮于100微升PBS中的黑色素瘤细胞。从肿瘤植入后的第7天开始,每周两次隔天用电子测微计进行肿瘤和体重测量。如果体重减轻 $>20\%$ 和/或肿瘤溃烂或大于 2500mm^3 ,则将处死小鼠。终点将是肿瘤的生长/存活、体重和血液中的免疫应答。

[0093] 抗原激发试验将遵循标准方案。简而言之,将分离的PBMC在 $100\mu\text{l}$ RPMI培养基中以200K细胞/孔的浓度置于96孔u型底板中。将细胞与来自1mM原液的适当抗原肽在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下孵育24小时。然后离心细胞,并收集上清液进行分析。

[0094] 其他实施方案

[0095] 实施方案1:一种药物组合物,其包含表达人类疾病相关抗原的基因工程细菌,其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖的生物合成所需的蛋白质。

[0096] 实施方案2:实施方案1的组合物,其中人类疾病相关抗原是患者特异性的。

[0097] 实施方案3:实施方案1或2的组合物,其中人类疾病相关抗原是肿瘤抗原。

[0098] 实施方案4:权利要求3的组合物,其中人类疾病相关抗原选自肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原以及肿瘤特异性新抗原和患者特异性新抗原。

[0099] 实施方案5:前述实施方案中任一项的组合物,其中基因工程细菌表达至少一种其他人类疾病相关抗原,优选其中人类疾病相关抗原表达为多表位,并且任选地其中多表位在抗原之间包含肽间隔区。

[0100] 实施方案6:前述实施方案中任一项的组合物,其中抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

[0101] 实施方案7:前述实施方案中任一项的组合物,其中人类疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

[0102] 实施方案8:前述实施方案中任一项的组合物,其中细菌为大肠杆菌。

[0103] 实施方案9:前述实施方案中任一项的组合物,其中基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

[0104] 实施方案10:前述实施方案中任一项的组合物,其中重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

[0105] 实施方案11:一种用于治疗患者的药物组合物,其包含:患者的内共生细菌,其中细菌经基因工程改造以表达患者的疾病相关抗原。

[0106] 实施方案12:根据实施方案11的组合物,其中进一步基因修饰内共生细菌以具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖的生物合成所需的蛋白质。

[0107] 实施方案13:权利要求11或12的组合物,其中疾病相关抗原选自肿瘤抗原、肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原以及肿瘤特异性新抗原和患者特异性新抗原。

[0108] 实施方案14:实施方案11至13中任一项的组合物,其中基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原,优选其中疾病相关抗原表达为多表位,并且任选地其中多表位在抗原之间包含肽间隔区。

[0109] 实施方案15:实施方案11至14中任一项的组合物,其中(a)至(d)中的任何一个或更多是一个符合事实的:(a)抗原还包含针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号;(b)疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂;(c)内共生细菌是大肠杆菌;和(d)重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

[0110] 实施方案16:前述实施方案中任一项的组合物在使用免疫疗法治疗患者或制备细菌疫苗中的用途。

[0111] 尽管所有实施方案都记载人类疾病相关抗原,但应注意,这些实施方案也适用于非人类,特别是哺乳动物疾病相关抗原。

[0112] 在一些实施方案中,用于描述和要求保护本发明某些实施方案的表示成分数量,性质例如浓度,反应条件等的数字应理解为在某些情况下被术语“约”修饰。因此,在一些实施方案中,在说明书和所附权利要求书中提出的数字参数是近似值,其可以根据通过特定实施方案寻求获得的期望特性而变化。本文中数值范围的列举仅旨在用作分别指代该范围内的每个单独数值的简写方法。除非本文另外指出,否则每个单独的值都被并入说明书中,就好像它在本文中被单独引用一样。除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序执行。相对于本文的某些实施方案提供的任何和所有示例或示例性语言(如“例如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,并且不对以其他方式要求保护的本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应解释为表示对实施本发明必不可少的任何未要求保护的要素。

[0113] 如本文的说明书和随后的整个权利要求中所使用的,除非上下文另外明确指出,否则在要素前不使用数字包括复数形式。而且,如本文的描述中所使用的,“在……中”的含义包括“在……中”和“在……上”,除非上下文另外明确指出。如本文中使用的,除非上下文另有指示,术语“结合”旨在包括直接结合(其中彼此集合的两个元件彼此接触)和间接集

合(其中至少一个附加元件位于两个元件之间)。因此,术语“结合”和“联合”同义地使用。

[0114] 对于本领域技术人员明显的是,在不背离本文的发明构思的前提下,除了已经描述的修改之外,还可以进行更多修改。因此,除了所附权利要求的范围之外,本发明主题不受限制。此外,在解释说明书和权利要求书时,应以与上下文一致的尽可能广泛的方式解释所有术语。特别地,术语“包括”和“包含”应被解释为以非排他性的方式指代元素、组件或步骤,表示所引用的元素、组件或步骤可能存在或使用,或其他未明确引用的元素、组件或步骤组合。如果说明书的权利要求指的是选自A、B、C……和N的至少一种,则该文本应解释为仅要求该组中的一个元素,而不是A加N或B加N等。

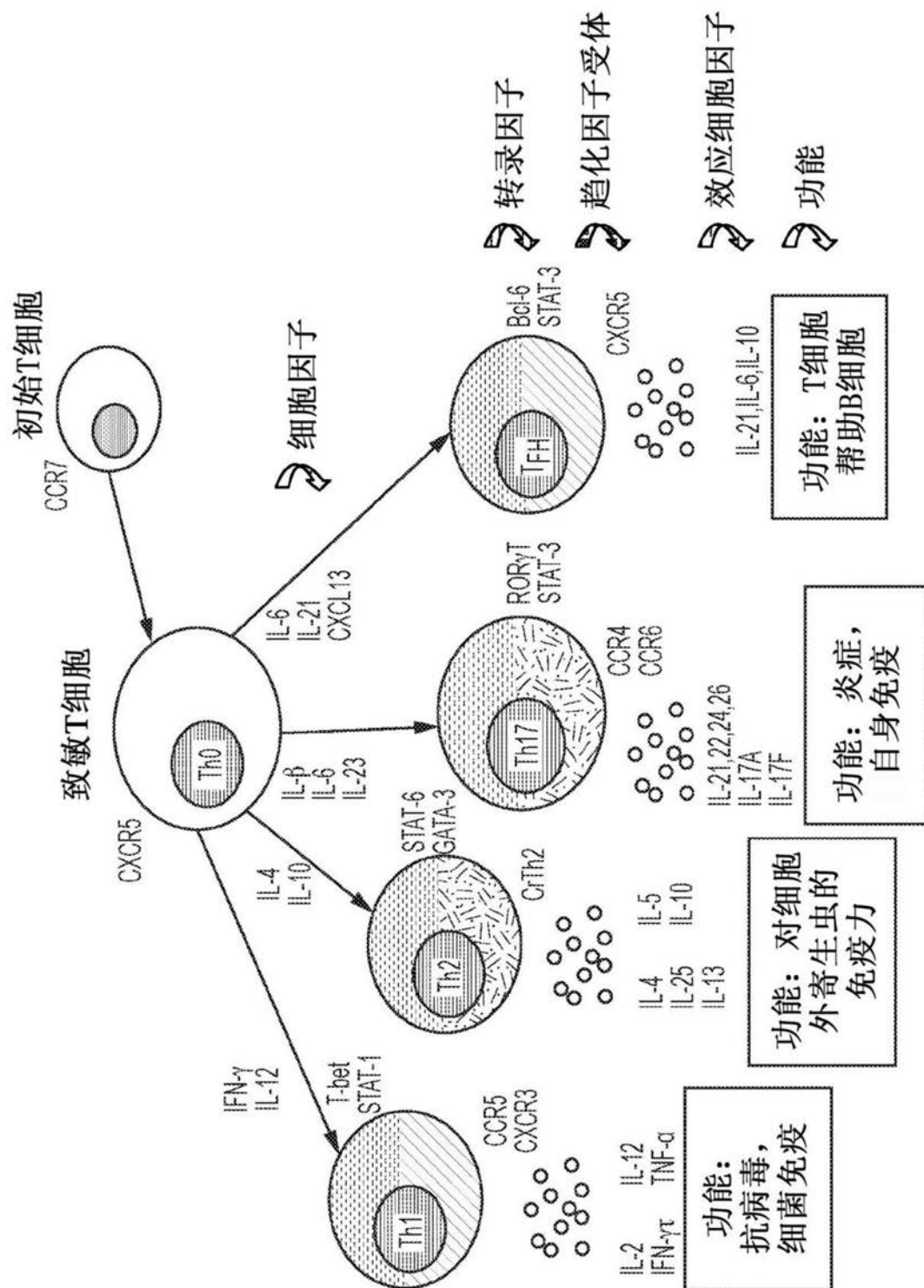


图1

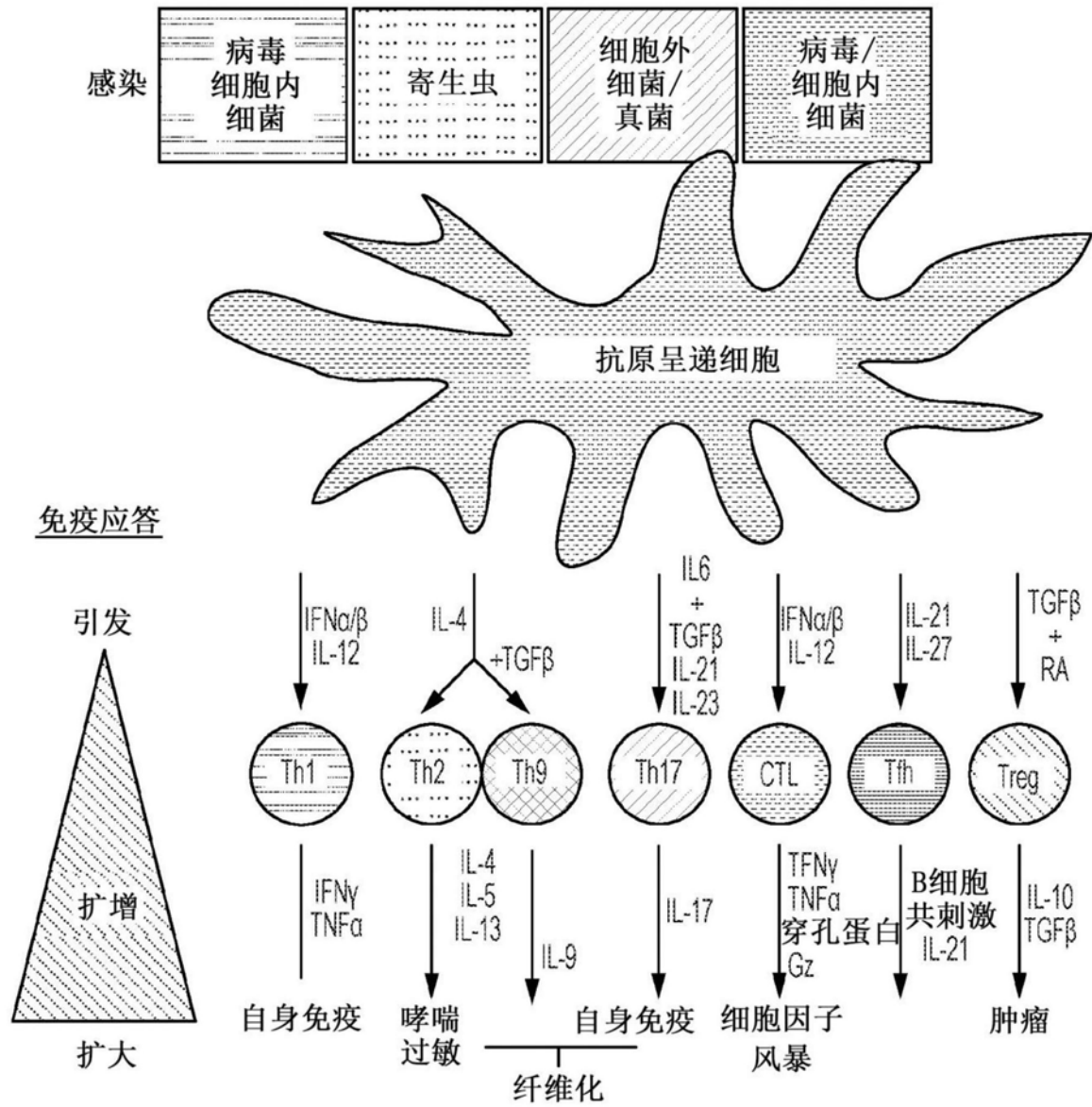


图1续

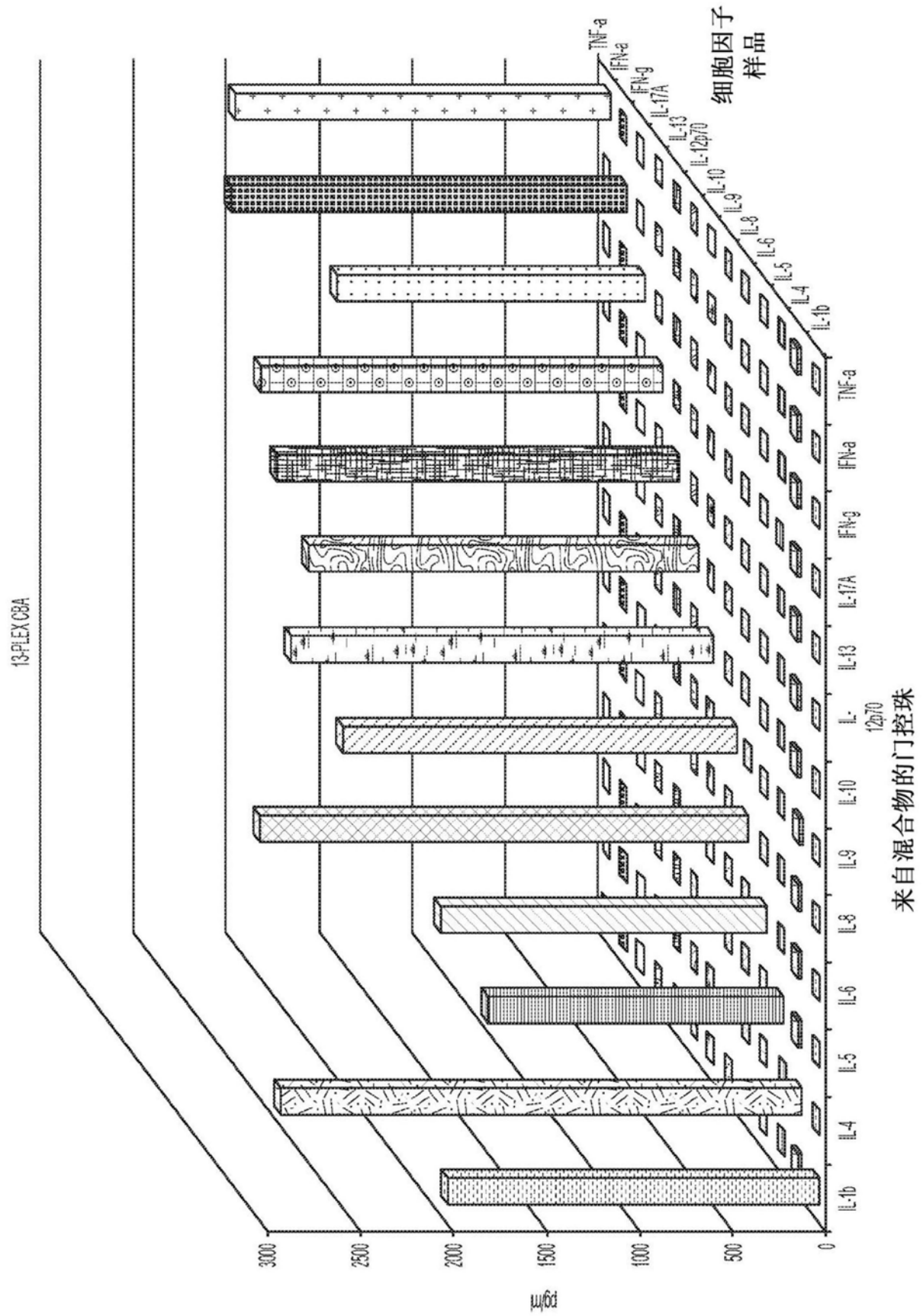


图2

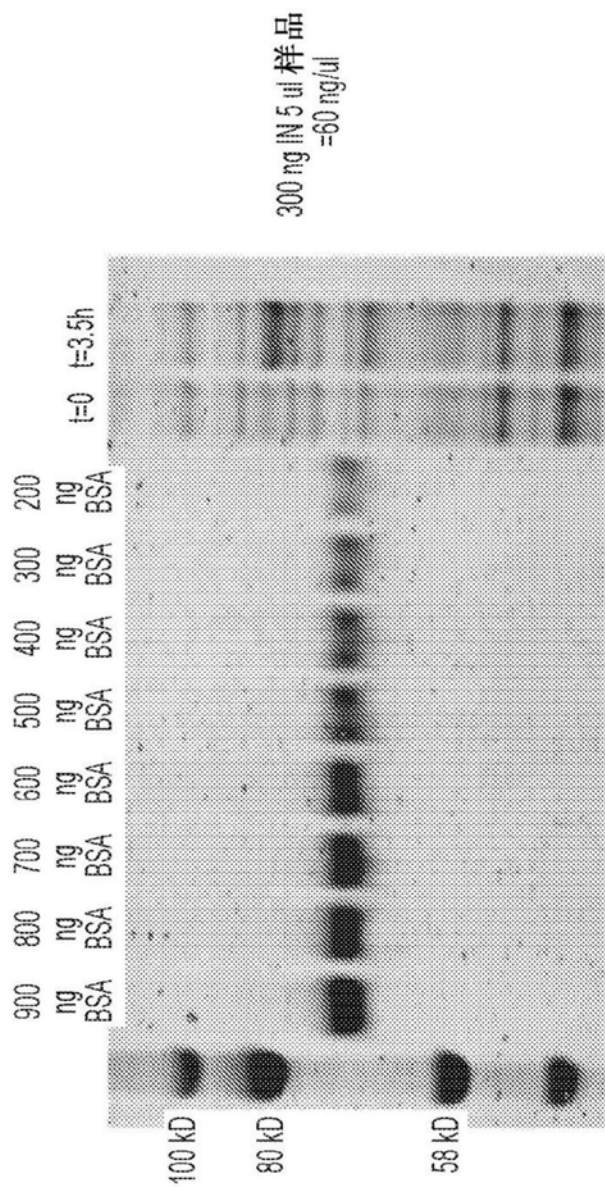


图3

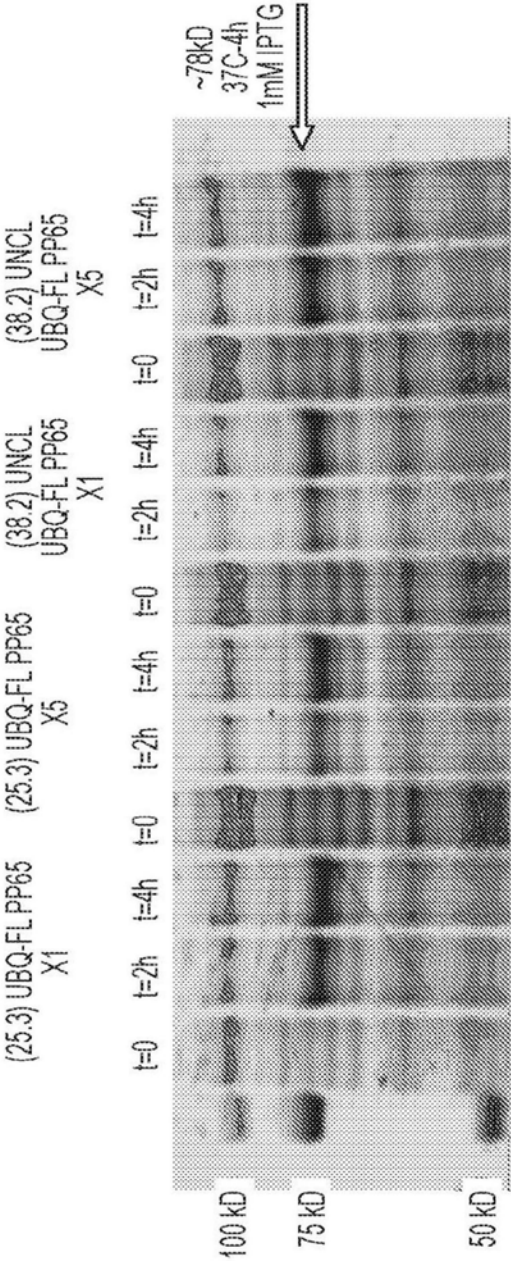


图4

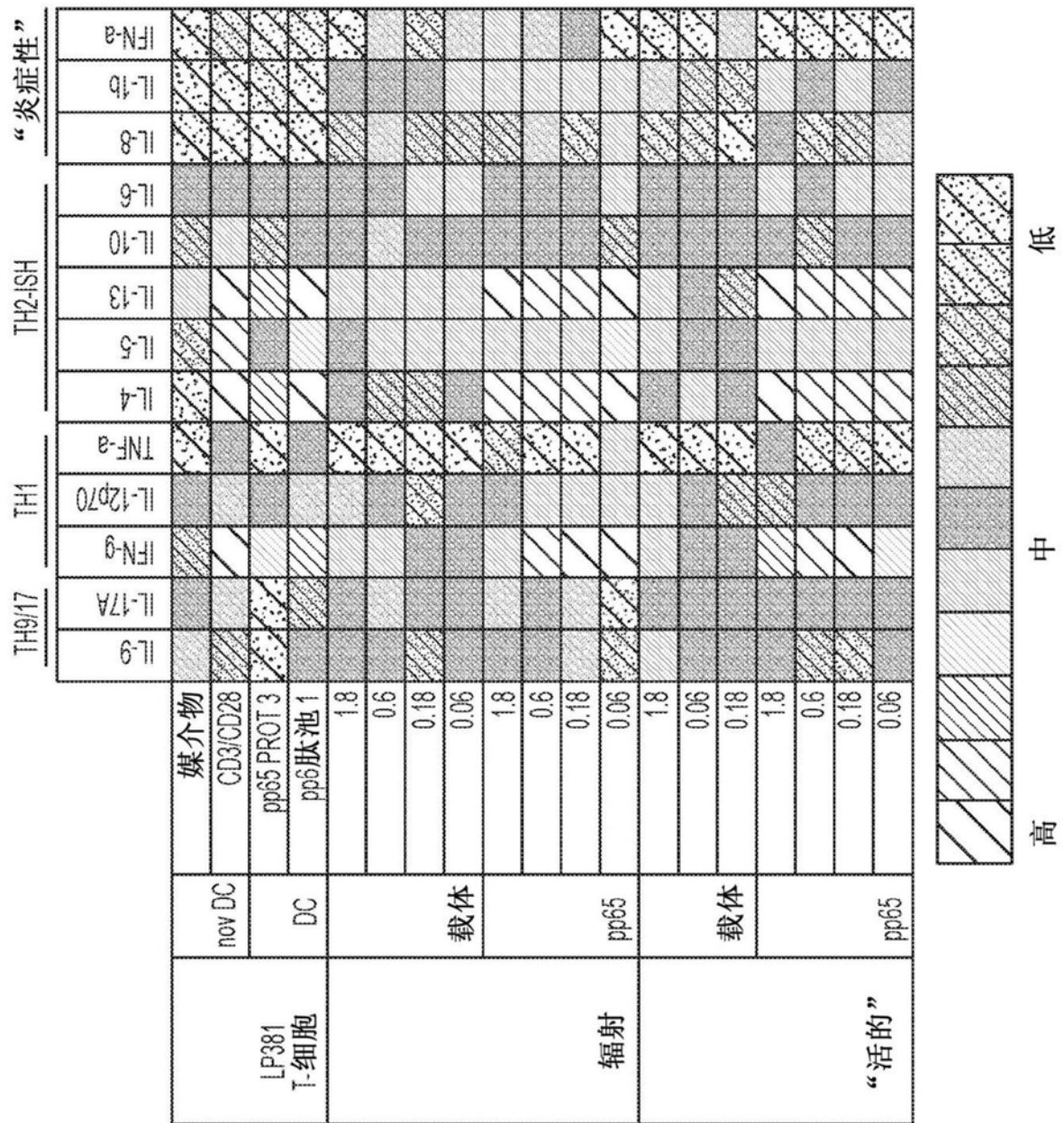


图5A

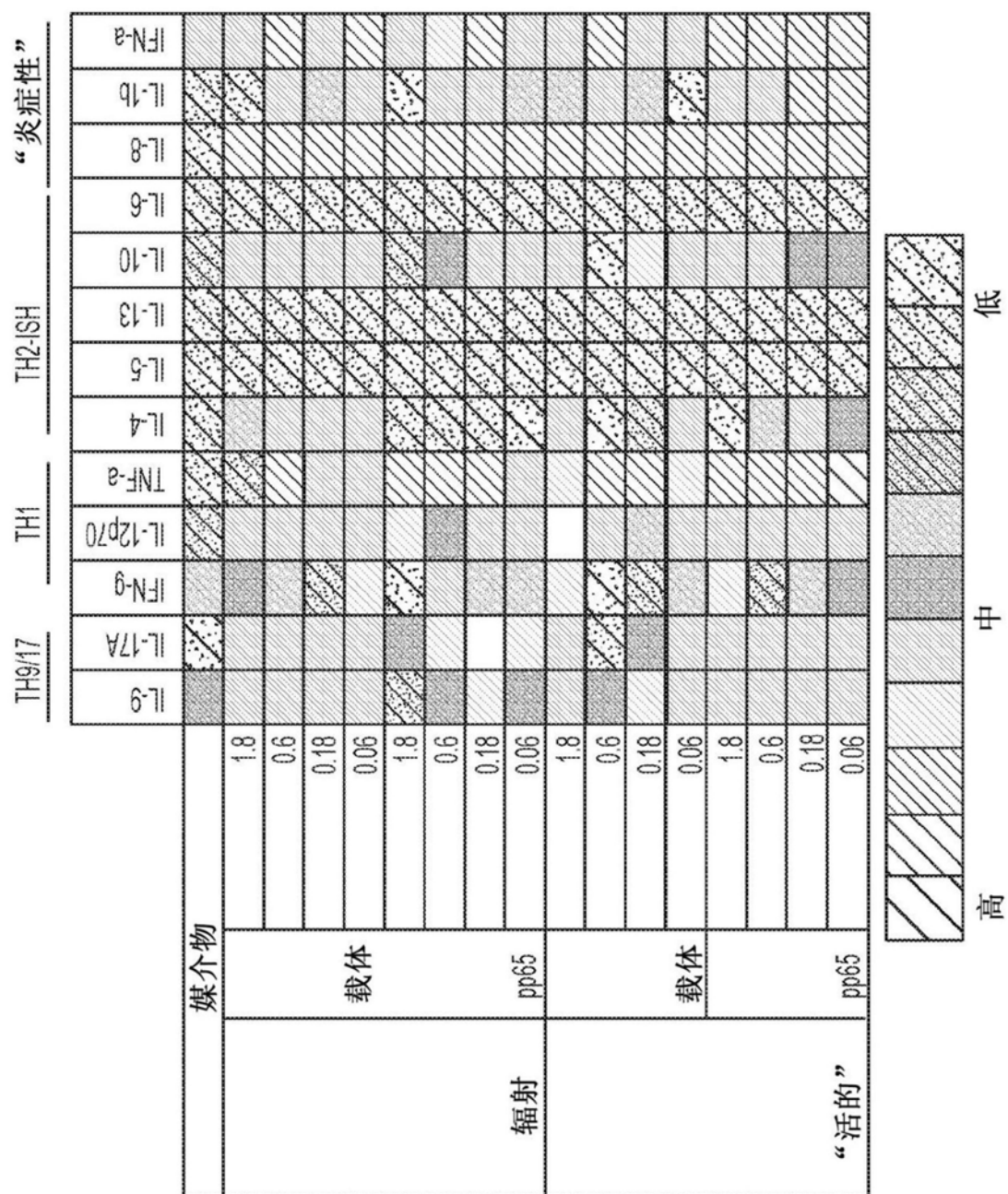


图5B

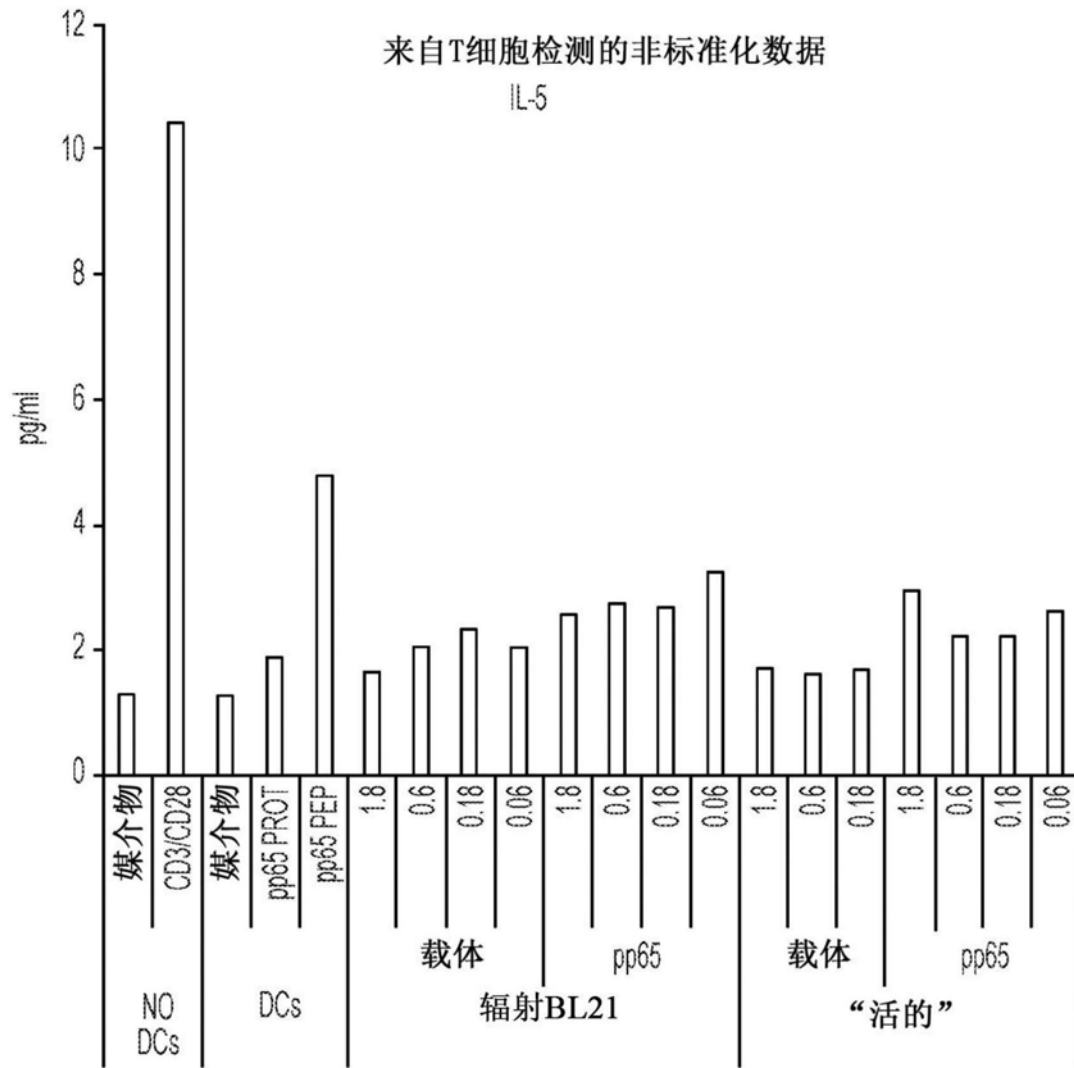


图6续

来自T细胞检测的非标准化数据

IL-13

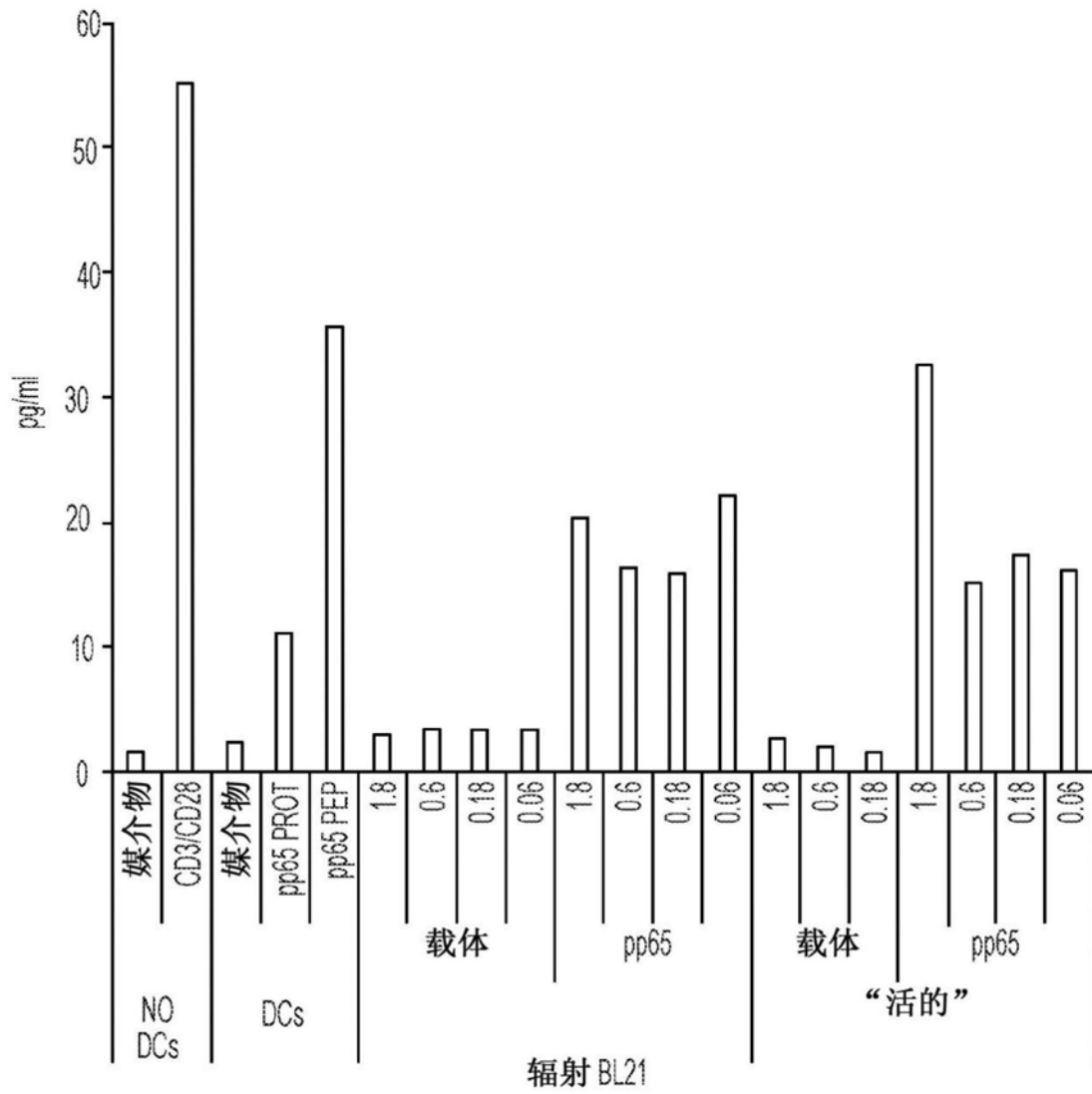


图7

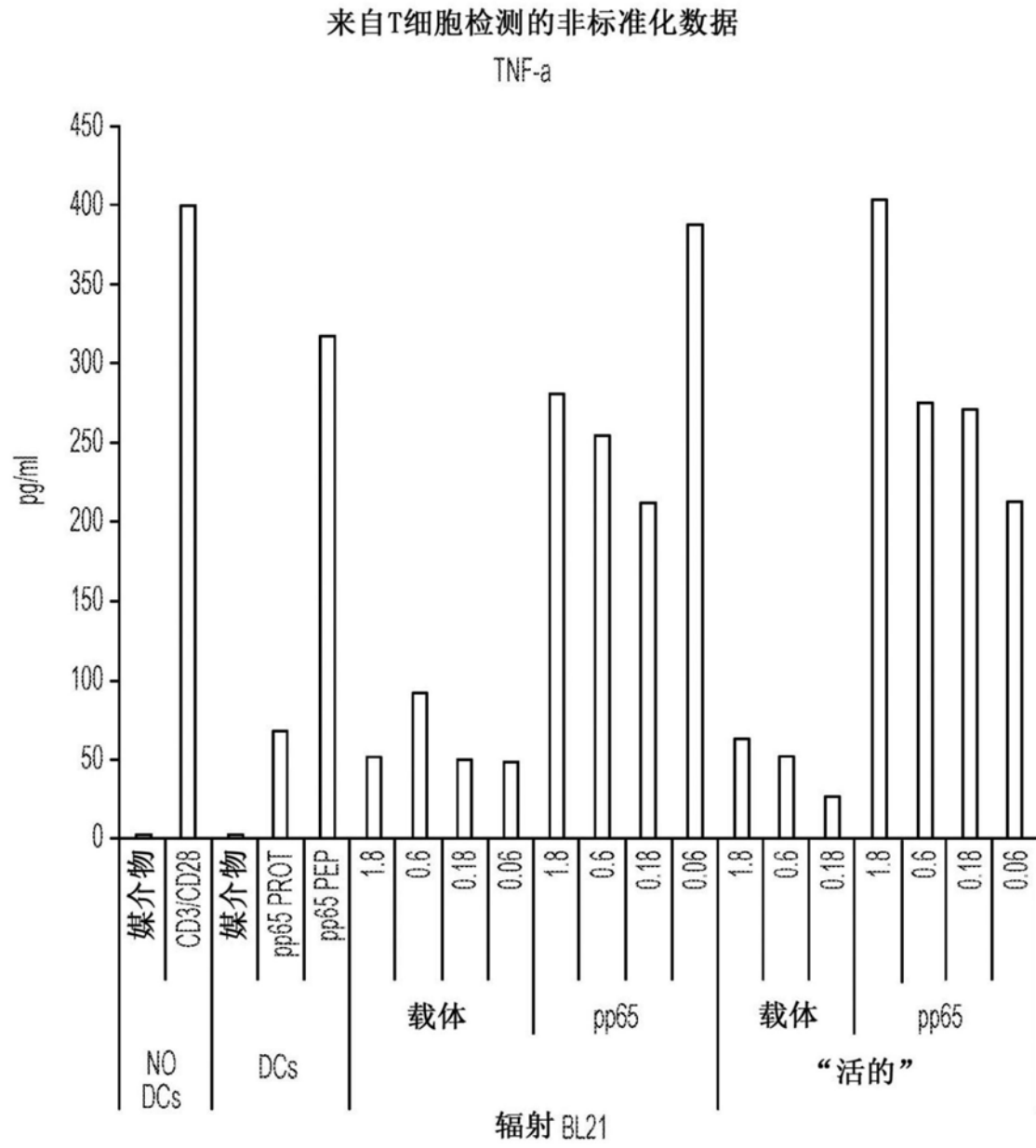


图7续

仅来自DCS的非标准化数据

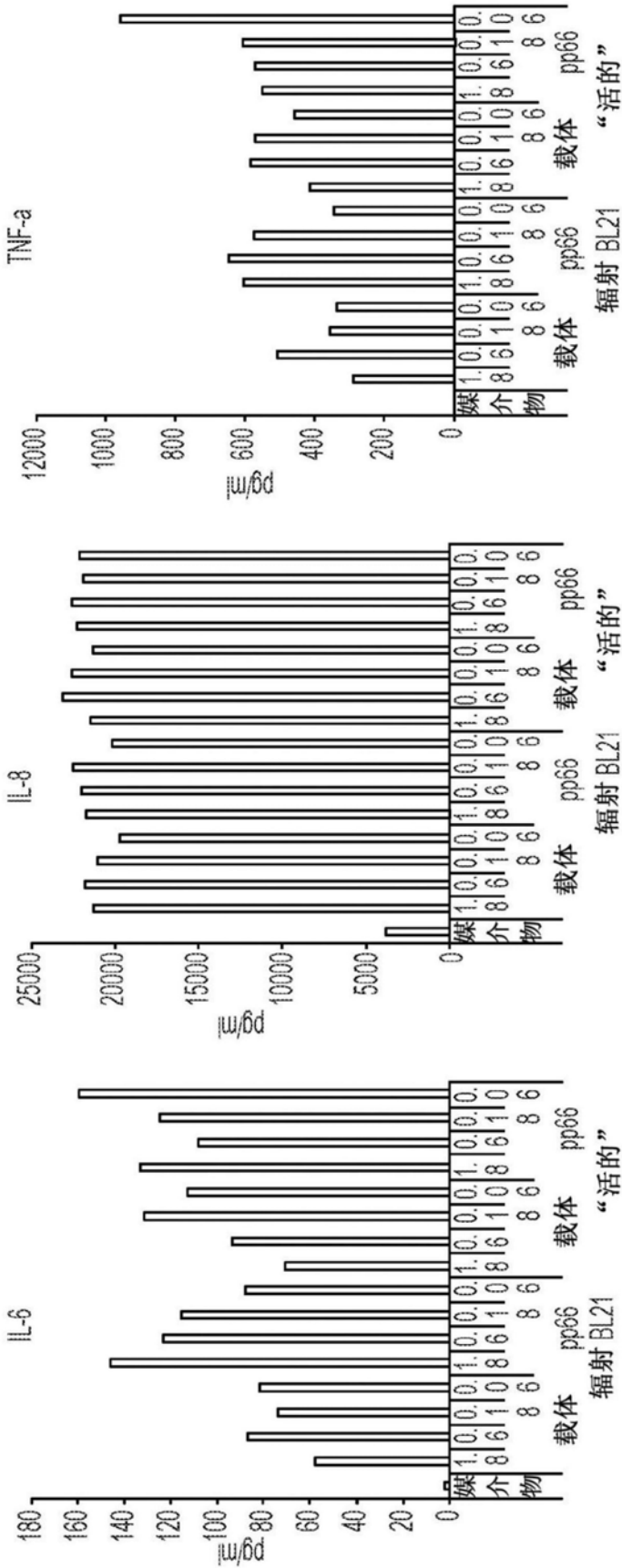


图8

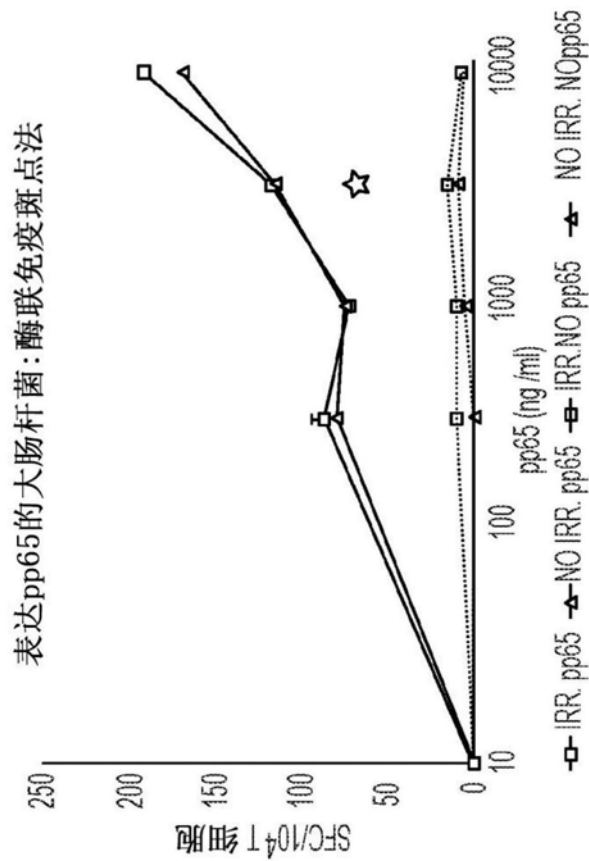


图9A

	300ng	900ng	3mg	9mg
IRR, pp65	87	72.7	118	191.7
NO IRR, pp65	79.7	75	115.7	169
IRR, NO pp65	9.7	9.7	15	7.3
NO IRR, NO pp65	-	5.3	9.3	8

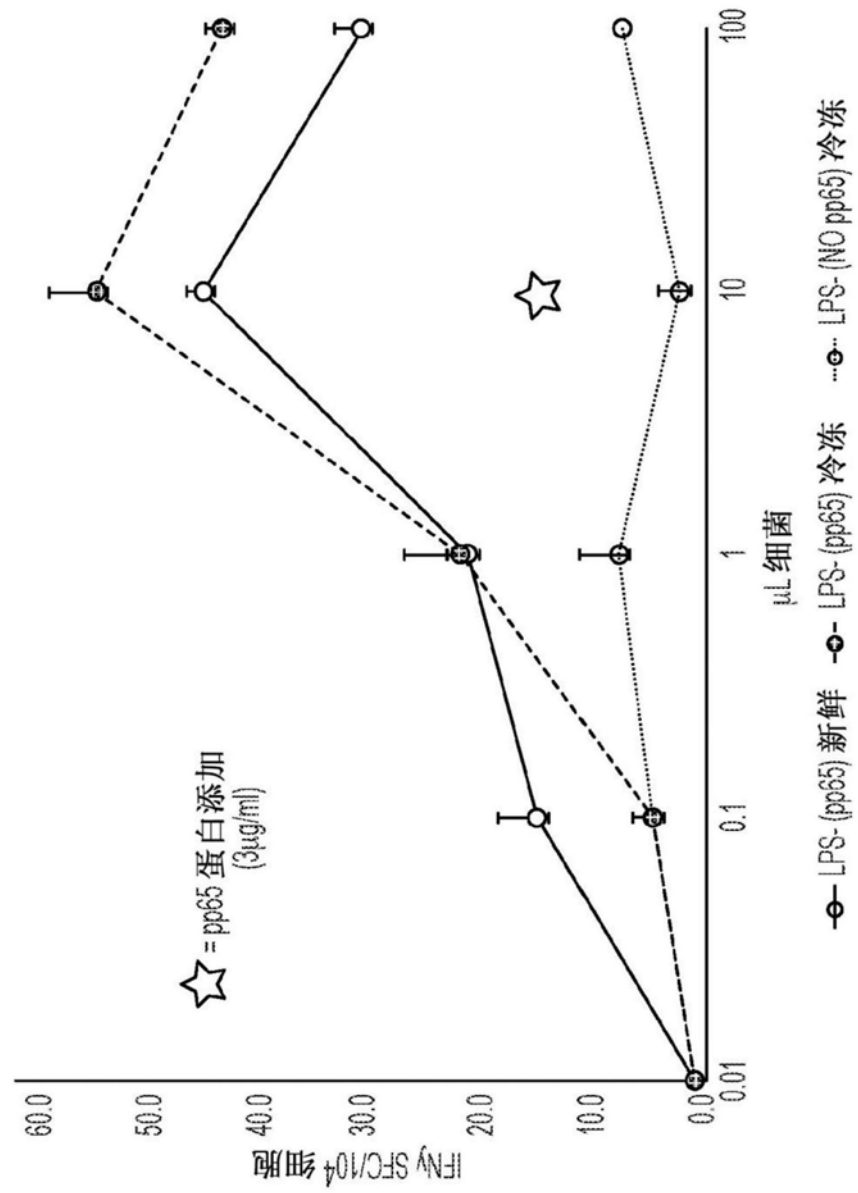


图9B

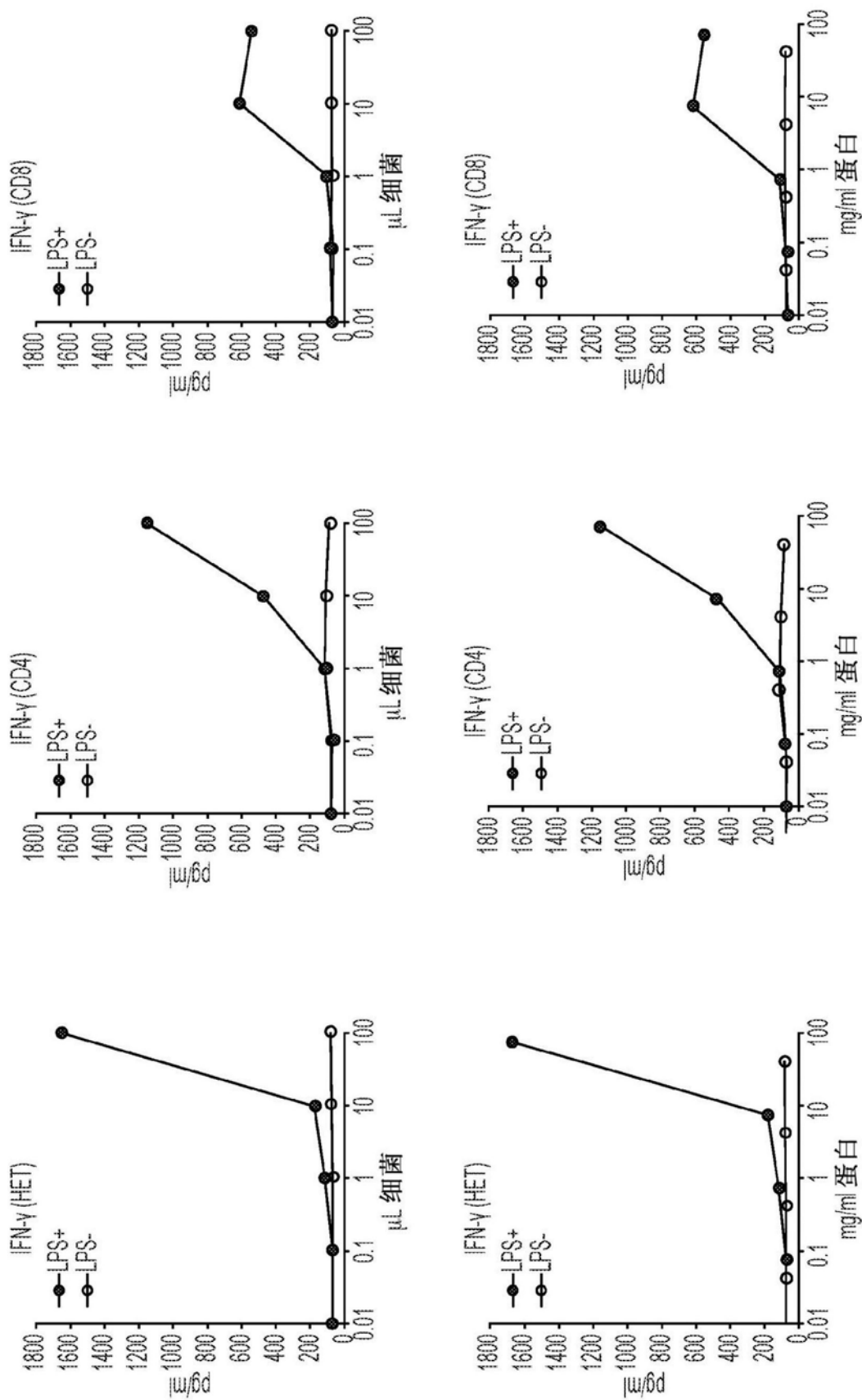


图10A

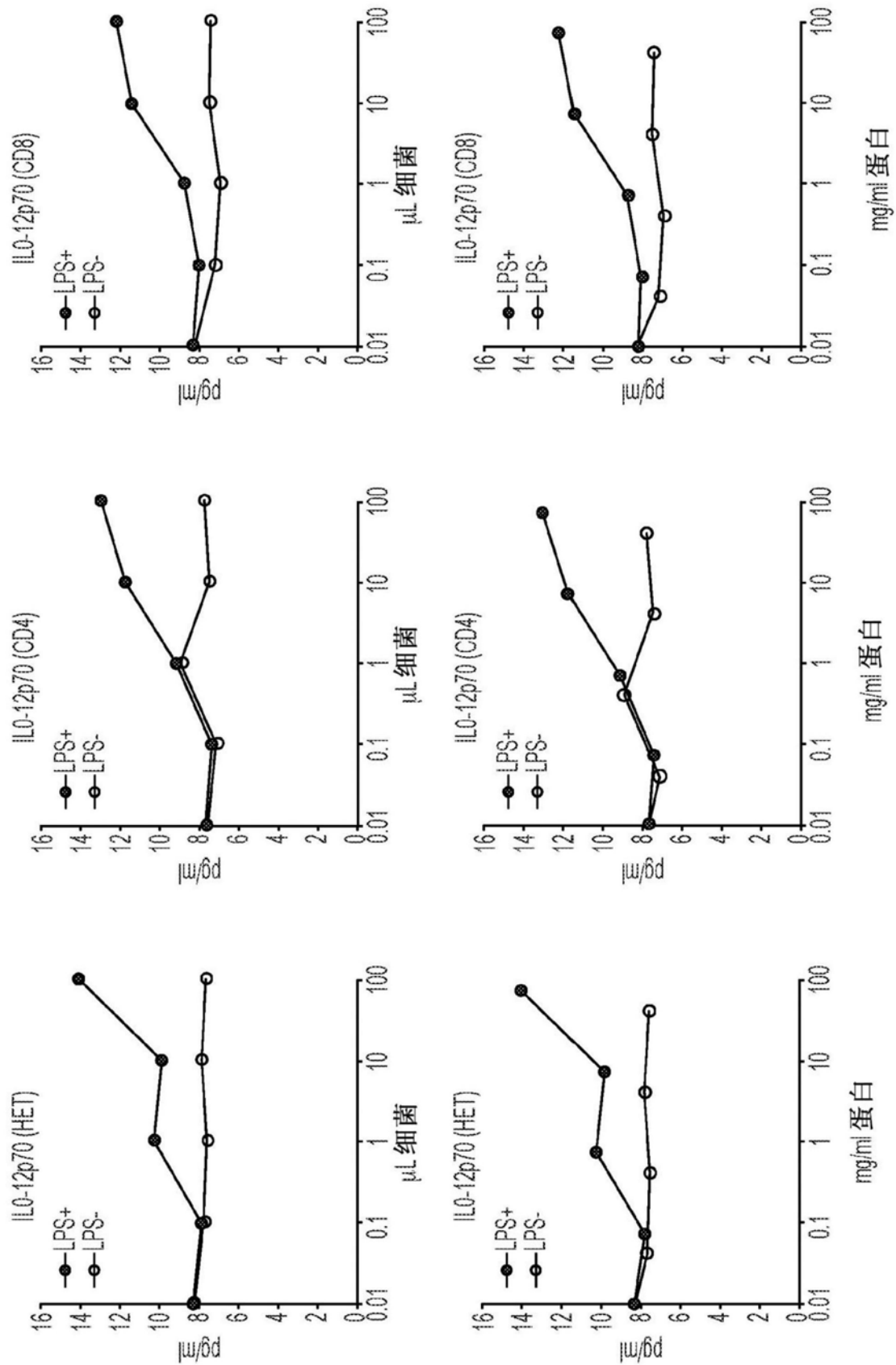


图10B

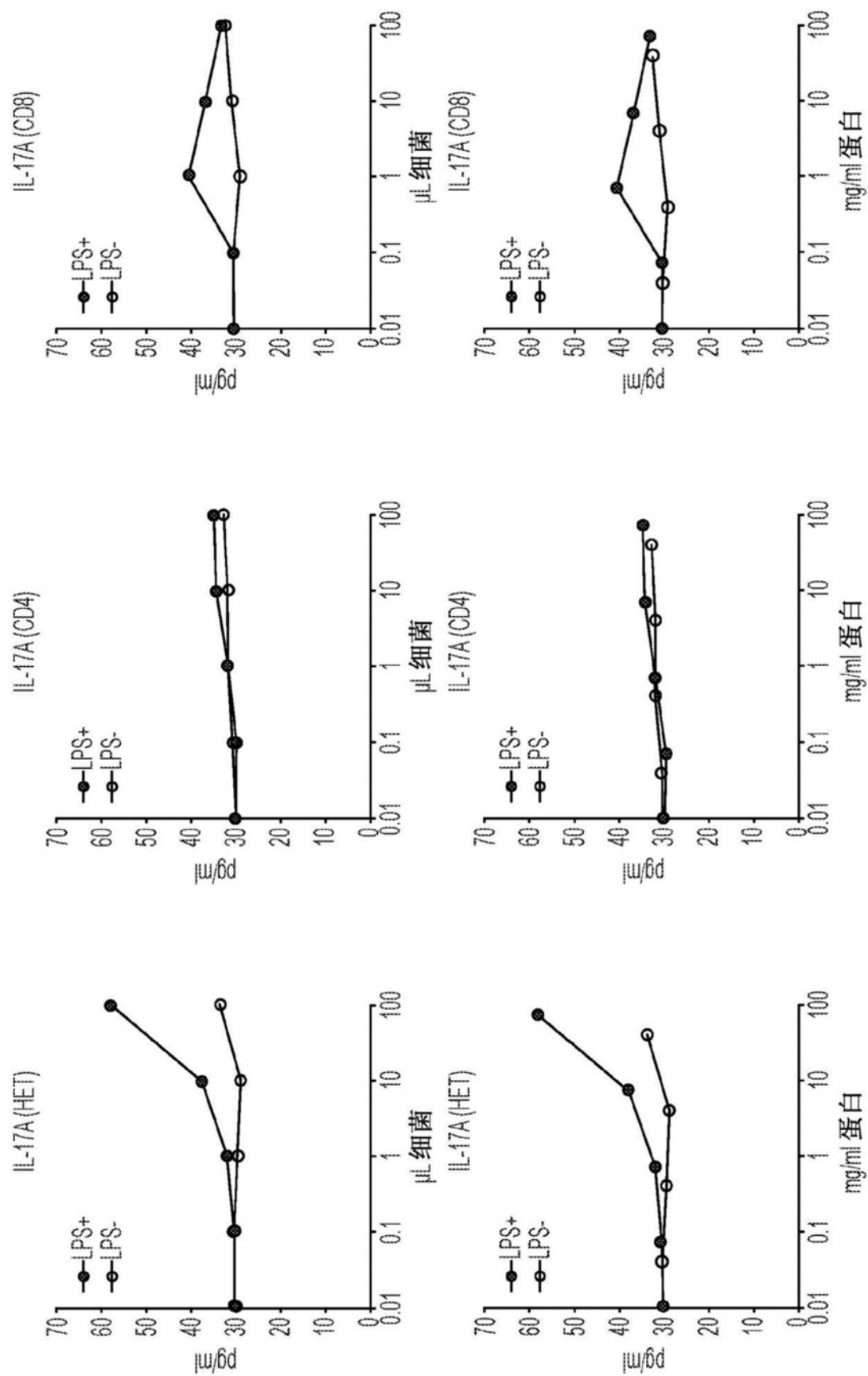


图10C

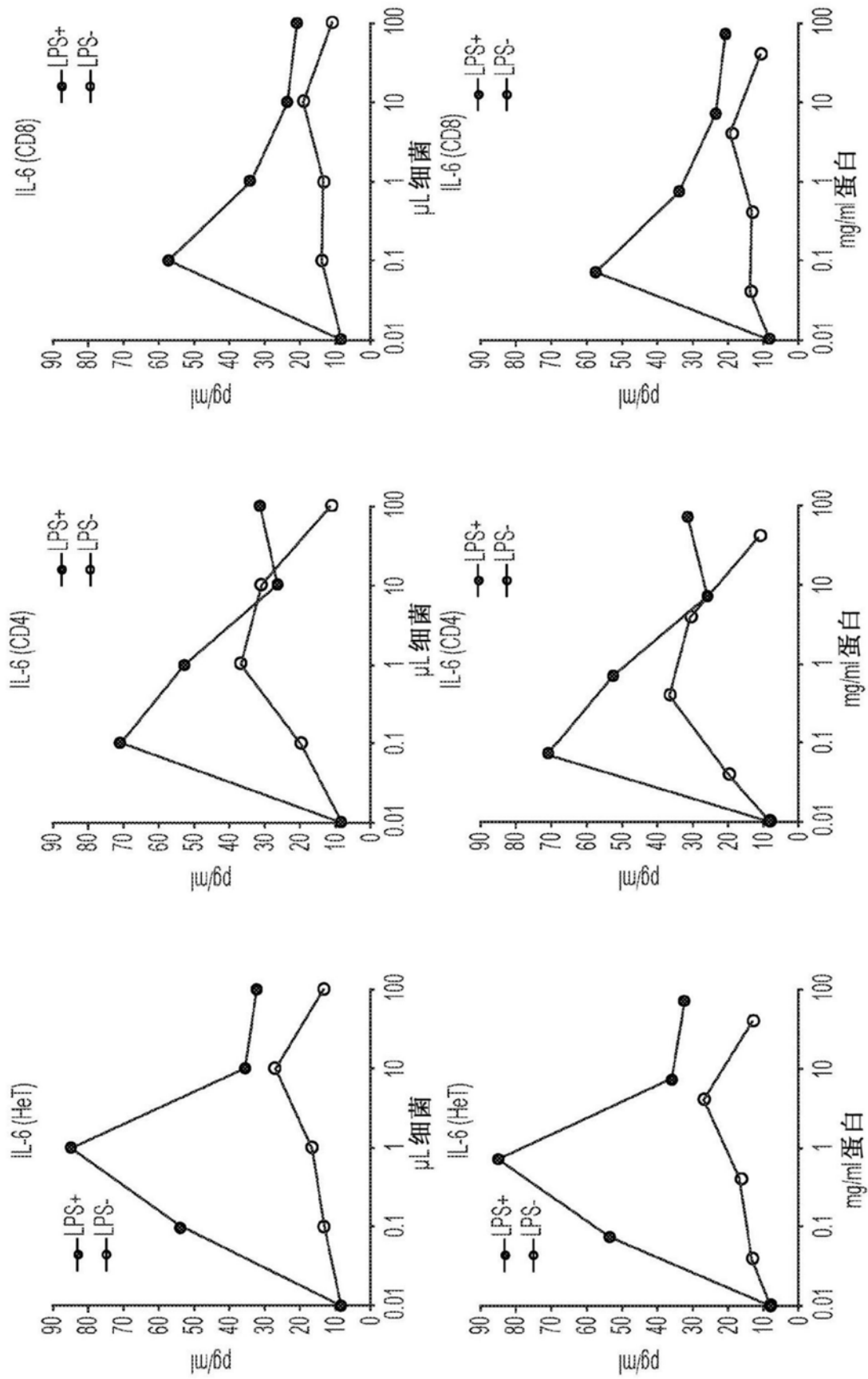


图10D

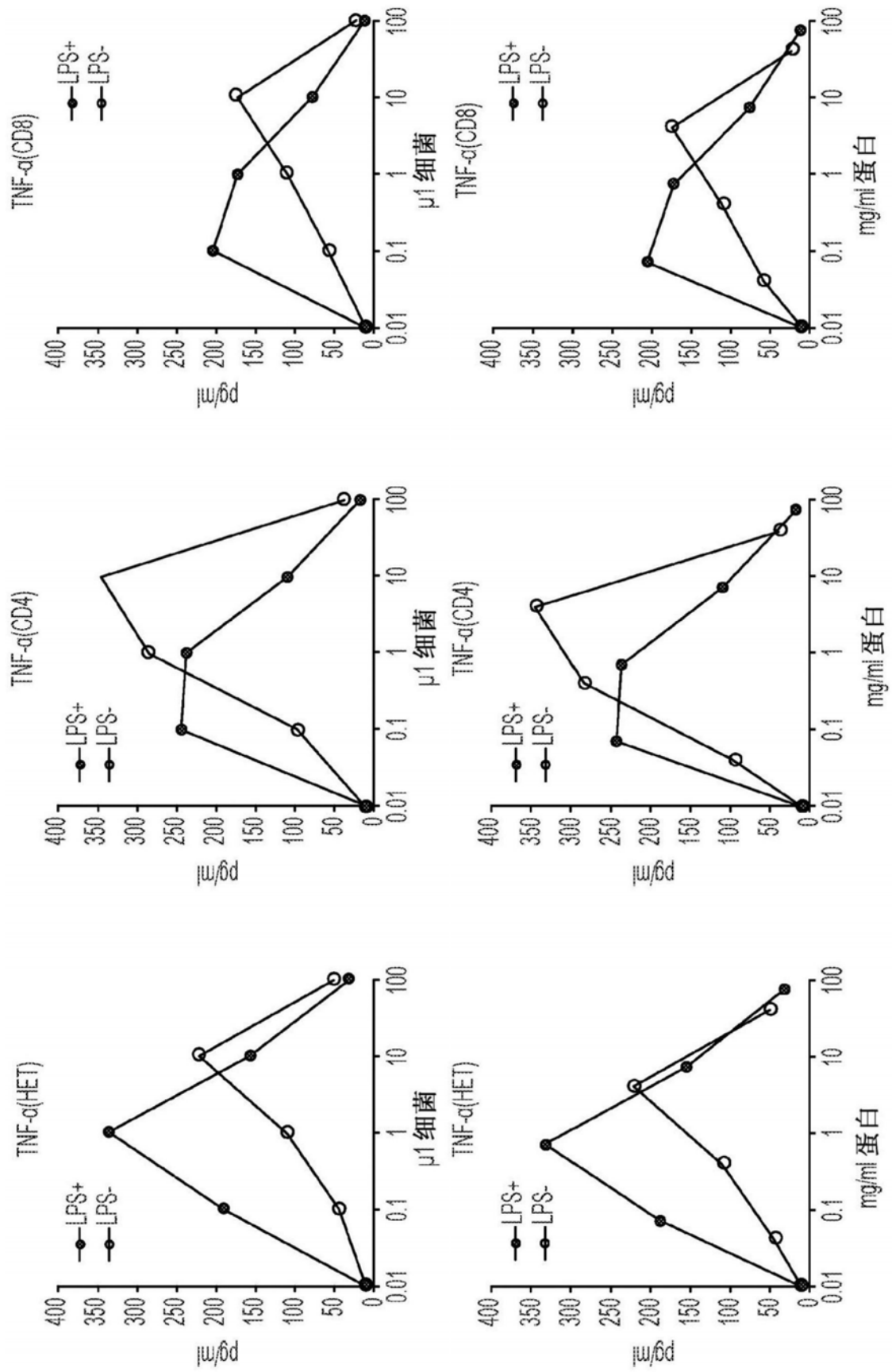


图10E

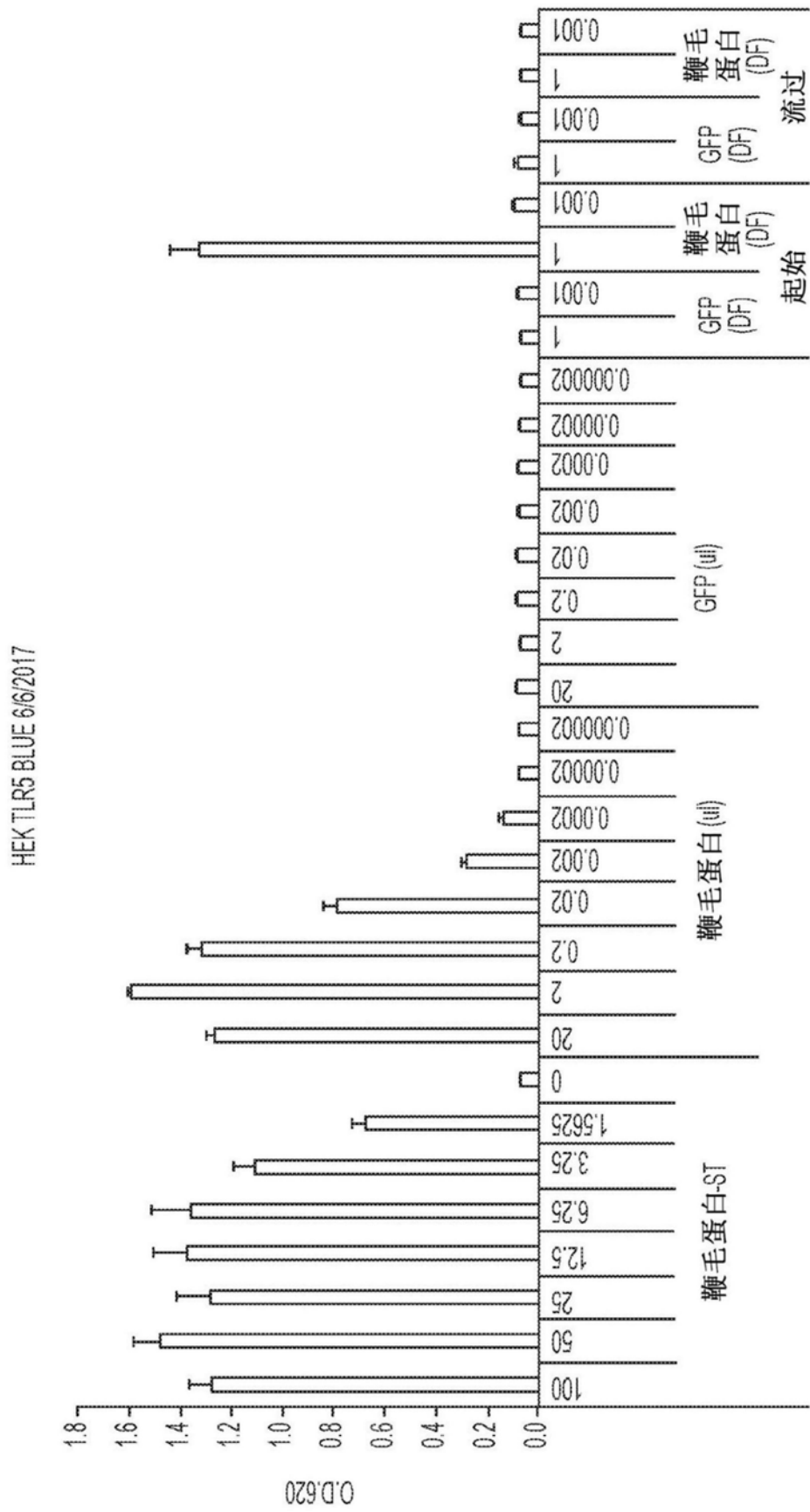


图11

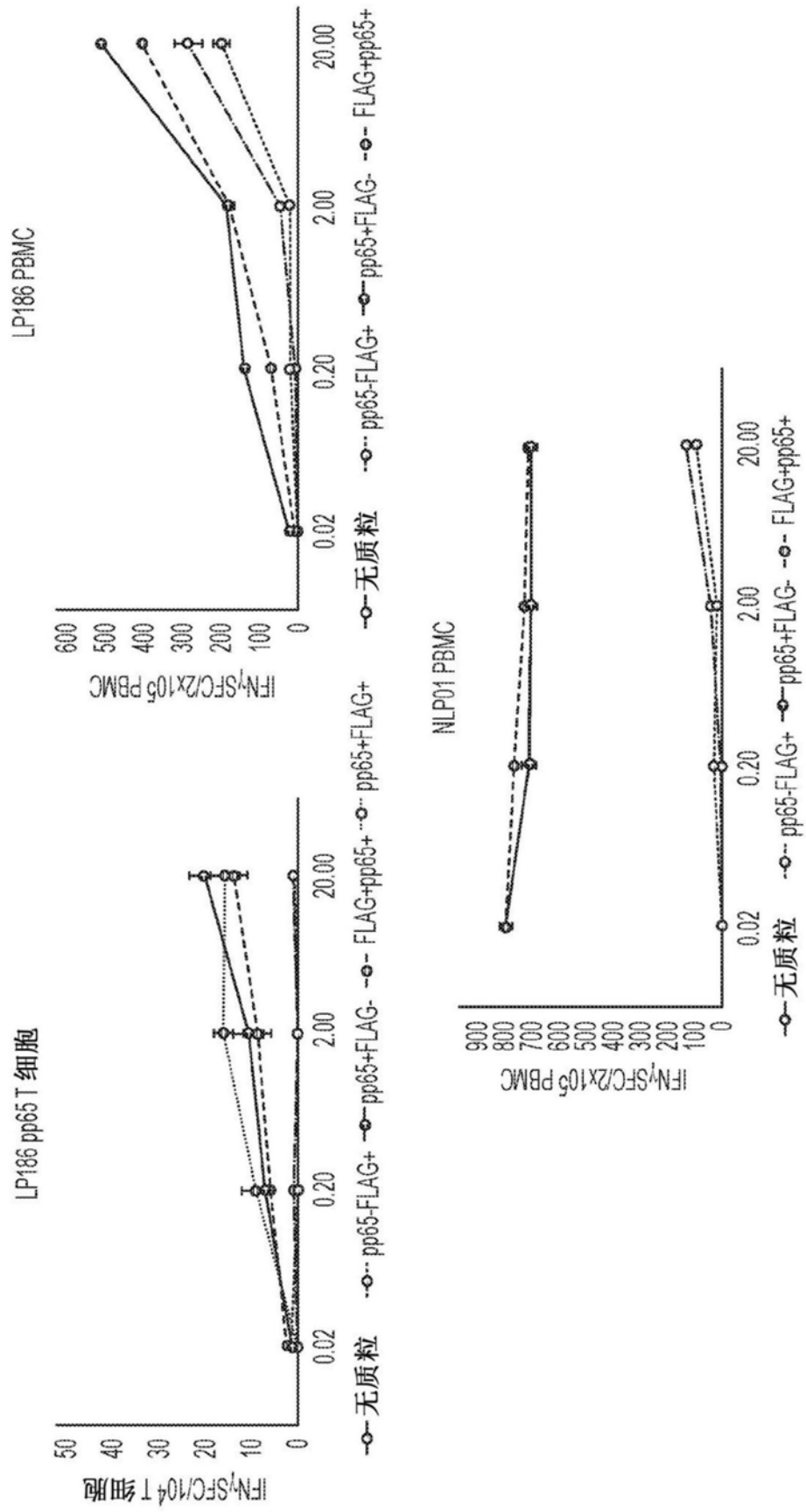


图12

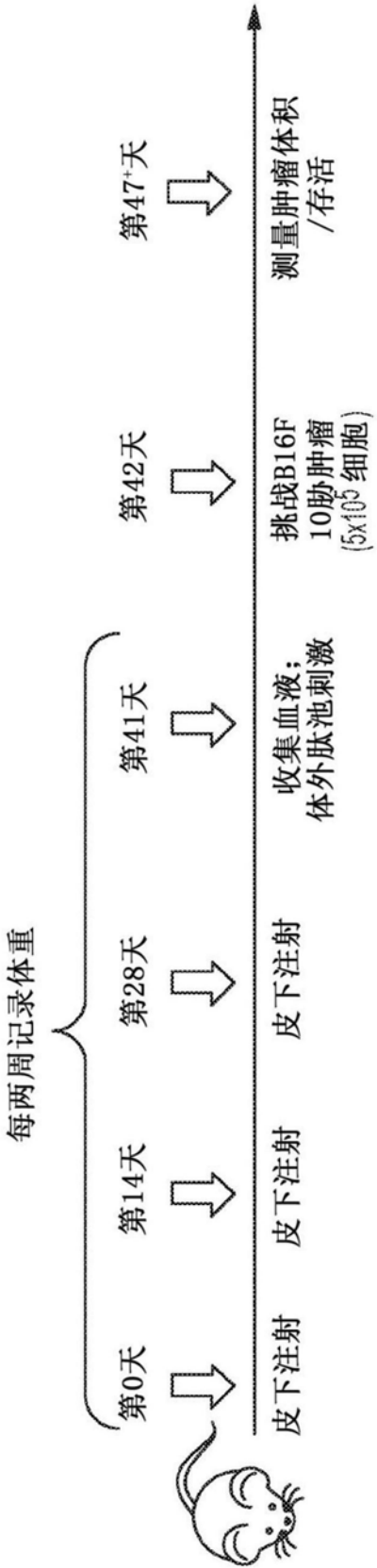


图13

1. 一种药物组合物,其包含:

从重组核酸表达疾病相关抗原的基因工程细菌,其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质;并且

其中所述基因工程细菌还从重组核酸表达TLR和/或NOD配体。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

5. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

6. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

11. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

12. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细菌为大肠杆菌。

13. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

14. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

15. 一种用于治疗患者的药物组合物,其包含:

患者的内共生细菌,其中细菌经基因工程改造以从重组核酸表达患者的疾病相关抗原。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中内共生细菌被进一步基因修饰以具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。

17. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

19. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

20. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

21. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

24. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

25. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

26. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述内共生细菌是大肠杆菌。

27. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

28. 一种生成用于免疫疗法的基因工程细菌的方法,其包括:

鉴定疾病相关抗原;

生成重组核酸以包含编码抗原和TLR和/或NOD配体的核酸序列;

用重组核酸转化细菌以生成表达抗原的基因工程细菌;并且

其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因,所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

33. 根据权利要求30所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

34. 根据权利要求28所述的方法,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

37. 根据权利要求28所述的方法,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

38. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

39. 根据权利要求28所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌。

40. 根据权利要求28所述的方法,其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

41. 根据权利要求28所述的方法,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

42. 根据权利要求28所述的方法,其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

43. 根据权利要求28所述的方法,其还包括辐射基因工程细菌。

44. 一种生成用于患者免疫疗法的基因工程细菌的方法,其包括:

鉴定疾病相关抗原;

生成重组核酸以包含编码抗原和TLR和/或NOD配体的核酸序列;和

用重组核酸转化患者的内共生细菌以生成表达抗原和TLR和/或NOD配体的基因工程细菌。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

46. 根据权利要求44所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
49. 根据权利要求46所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。
50. 根据权利要求46所述的方法,其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。
51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。
52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。
53. 根据权利要求44所述的方法,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。
54. 根据权利要求44所述的方法,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。
55. 根据权利要求44所述的方法,其中所述内共生细菌是大肠杆菌。
56. 根据权利要求44所述的方法,其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。
57. 根据权利要求44所述的方法,其中所述重组核酸包含诱导型启动子。
58. 根据权利要求44所述的方法,其还包括辐射基因工程细菌。
59. 一种使用免疫疗法治疗患者的方法,其包括:
鉴定疾病相关抗原;
生成重组核酸以包含编码疾病相关抗原的核酸序列;
生成选自基因工程细菌、基因工程酵母和基因工程病毒的至少两种不同的基因工程实体,以包含重组核酸;
通过施用基因工程细菌在患者中诱导第一免疫应答;和
通过施用基因工程酵母或基因工程实体在患者中诱导第二免疫应答。
60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。
61. 根据权利要求59所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。
62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。
63. 根据权利要求61所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。
64. 根据权利要求61所述的方法,其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。
65. 根据权利要求59所述的方法,其中所述重组核酸包含编码另一种疾病相关抗原的另一种核酸序列。
66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述疾病相关抗原表达为多表位。
67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。
68. 根据权利要求59所述的方法,其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。
69. 根据权利要求59所述的方法,其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。
70. 根据权利要求59所述的方法,其中所述细菌为大肠杆菌。

71. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

72. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

73. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

74. 根据权利要求59所述的方法, 其还包括在施用前辐射基因工程细菌。

75. 根据权利要求59所述的方法, 其还包括共同施用共刺激分子和检查点抑制剂。

76. 根据权利要求59所述的方法, 其中第一基因工程实体是基因工程细菌, 第二基因工程实体是基因工程酵母。

77. 根据权利要求59所述的方法, 其中第二基因工程实体是基因工程酵母。

78. 根据权利要求59所述的方法, 其中第二基因工程实体是基因工程病毒。

79. 根据权利要求59所述的方法, 其中以两种不同途径施用第一基因工程实体和第二基因工程实体, 其中两种不同途径选自皮下注射、静脉内注射、肿瘤内注射、肌肉注射、皮内注射、脑内注射、脑室内注射、口服施用、局部施用、吸入、舌下施用和经黏膜施用。

80. 根据权利要求59所述的方法, 其中施用第一基因工程实体是初次施用, 施用第二基因工程实体是加强施用。

81. 一种使用免疫疗法治疗患者的方法, 其包括:

鉴定疾病相关抗原;

生成重组核酸以包含编码抗原和TLR和/或NOD配体的核酸序列;

用重组核酸转化细菌以生成表达抗原的基因工程细菌; 和

向患者施用基因工程细菌, 其中所述细菌具有至少一个经修饰或缺失的基因, 所述基因编码脂多糖生物合成所需的蛋白质。

82. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

83. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

84. 根据权利要求83所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

85. 根据权利要求83所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

86. 根据权利要求83所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

87. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

89. 根据权利要求88所述的方法, 其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

90. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

91. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

92. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述细菌为大肠杆菌。

93. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述基因工程细菌表达的内毒素水平不足以诱导CD-14介导的脓毒症。

94. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

95. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

96. 根据权利要求81所述的方法, 其还包括在施用前辐射基因工程细菌。

97. 根据权利要求81所述的方法, 其还包括共同施用共刺激分子和检查点抑制剂。

98. 一种使用免疫疗法治疗患者的方法, 其包括:

鉴定疾病相关抗原;

生成重组核酸以包含编码抗原的核酸序列;

用重组核酸转化患者的内共生细菌以生成表达抗原的基因工程细菌; 和

向患者施用基因工程细菌。

99. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是患者特异性的。

100. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤抗原。

101. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤相关抗原。

102. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原。

103. 根据权利要求100所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是肿瘤特异性抗原和患者特异性抗原。

104. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述基因工程细菌表达至少一种其他疾病相关抗原。

105. 根据权利要求104所述的方法, 其中所述疾病相关抗原表达为多表位。

106. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述多表位在抗原之间包含肽间隔区。

107. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述抗原还包括针对至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型呈递抗原的运输信号。

108. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述疾病相关抗原是针对患者的HLA型的至少一种I类MHC亚型或至少一种II类MHC亚型的高亲和力结合剂。

109. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述细菌为大肠杆菌。

110. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述重组核酸还包含编码共刺激分子的序列和编码检查点抑制剂的序列中的至少一种。

111. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述重组核酸包含诱导型启动子。

112. 根据权利要求98所述的方法, 其还包括在施用前辐射基因工程细菌。

113. 根据权利要求98所述的方法, 其还包括共同施用共刺激分子和检查点抑制剂。

114. 根据权利要求1至27所述的药物组合物在使用免疫疗法治疗患者中的用途。

115. 根据权利要求1至27所述的药物组合物在制备细菌疫苗中的用途。