

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880018401.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/38 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101678093A

[22] 申请日 2008.4.11

[21] 申请号 200880018401.2

[30] 优先权

[32] 2007. 6. 1 [33] US [31] 60/941,524

[86] 国际申请 PCT/US2008/060044 2008.4.11

[87] 国际公布 WO2008/150577 英 2008.12.11

[85] 进入国家阶段日期 2009.12.1

[71] 申请人 亨利·M·杰克逊军事医学促进基金会

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 G·E·皮普尔斯 P·沙提巴兰

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 2 页 说明书 39 页 序列表 8 页
附图 17 页

[54] 发明名称

预防乳腺癌复发的疫苗

[57] 摘要

本发明涉及诱发并维持对于 HER2/neu 原癌基因 E75 的肽保护性细胞毒性 T 淋巴细胞应答的方法, 具有针对于乳腺癌临床缓解患者诱发及维持保护性或治疗性免疫的效果。该方法包括以最佳剂量和方案给予患者有效量的包括可药用载体、诸如重组人 GM-CSF 的佐剂以及 E75 肽的疫苗组合物。由于降低的 E75 特异性 T 细胞免疫, 该方法还包括给予每年或每半年的加强剂疫苗剂量。本发明也涉及用于此方法的疫苗组合物。

1、诱导受试者抗乳腺癌复发的保护性或治疗性免疫的方法，包括给予受试者有效量的包括药学有效载体和具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的肽的组合物。

2、权利要求 1 的方法，其中通过注射或接种给予该组合物。

3、权利要求 2 的方法，其中该注射是皮内注射。

4、权利要求 2 的方法，其中该组合物以一个或多个分次剂量注射。

5、权利要求 4 的方法，其中该剂量含有最佳量的该肽。

6、权利要求 4 的方法，其中身体上的注射位点彼此位置隔开约 5cm。

7、权利要求 1 的方法，其中在 6 个月中给予该组合物 6 次，直到建立保护性免疫。

8、权利要求 1 的方法，还包括给予该受试者加强剂，该加强剂包括有效量的包括药学有效载体和具有 SEQ ID NO:2 的肽的疫苗加强剂组合物。

9、权利要求 8 的方法，其中通过注射给予该加强剂组合物。

10、权利要求 9 的方法，其中该注射是皮内注射。

11、权利要求 8 的方法，其中该加强剂组合物以一个或多个分开剂量注射。

12、权利要求 11 的方法，其中两个剂量含有相同浓度的该肽。

13、权利要求 11 的方法，其中身体上的注射位点彼此位置隔开约 5cm。

14、权利要求 8 的方法，其中在完成初次免疫方案后每 6 个月或 12 个月给予该加强剂。

15、权利要求 1 的方法，其中受试者是人。

16、权利要求 15 的方法，其中人表达人白细胞抗原 A2。

17、权利要求 15 的方法，其中人表达人白细胞抗原 A3。

18、权利要求 15 的方法，其中人表达可测水平的 HER2/neu。

19、权利要求 18 的方法，其中人对于 HER2/neu 基因表达具有免疫组织化学 (IHC) 等级 1⁺ 或 2⁺ 的蛋白表达，荧光原位杂交 (FISH) 等级大于

约 0 至小于约 2.0。

20、权利要求 18 的方法，其中人对于 HER2/*neu* 基因表达具有免疫组织化学 (IHC) 等级 3⁺ 的过表达，荧光原位杂交 (FISH) 等级大于约 2.0。

21、权利要求 1 的方法，其中受试者在被诊断为结阳性或结阴性乳腺癌后处于完全临床缓解状态。

22、权利要求 1 的方法，其中受试者处于乳腺癌的部分临床缓解状态。

23、权利要求 1 的方法，其中该组合物还包括佐剂。

24、权利要求 23 的方法，其中该佐剂是重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

25、权利要求 8 的方法，其中疫苗加强剂组合物还包括佐剂。

26、权利要求 23 的方法，其中该佐剂是重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

27、权利要求 1 的方法，其中给予该组合物诱导对于具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞应答。

28、权利要求 15 的方法，其中人具有结阳性乳腺癌。

29、权利要求 15 的方法，其中人具有结阴性乳腺癌。

30、疫苗组合物，其包括可药用载体、有效量的具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的肽、以及佐剂。

31、权利要求 30 的组合物，其中该佐剂是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

32、权利要求 30 的组合物，其中肽的有效量是 1mg/ml，佐剂剂量为 0.1 和 0.5mg/ml 之间。

33、权利要求 30 的组合物，其中肽的有效量是 1mg/ml，佐剂剂量为 0.25mg/ml。

34、权利要求 30 的组合物，其中肽的有效量是 1mg/ml，佐剂剂量为 0.125mg/ml。

预防乳腺癌复发的疫苗

相关申请的交叉引用

本申请主张 2007 年 6 月 1 日递交的美国申请 No. 60/941, 524 的权益，其全部公开内容在此通过引用作为参考。

领域

本发明主要涉及预防性以及治疗性疫苗领域。更具体地，本发明涉及用于在乳腺癌缓解患者中治疗乳腺癌以及预防复发的肽疫苗。

背景

该说明书通篇引用了多种出版物，包括专利、公开的申请、技术文章以及学位文章。出于所有目的，这些引用的出版物中每篇都在此通过整体引用作为参考。

乳腺癌 (BCa) 是女性最常见的癌症诊断并且是女性中与癌症相关死亡的第二主导因素 (Ries LAG 等人 (编) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute, Bethesda, MD)。过去 20 年间在乳腺癌治疗中的主要进展使得无疾病生存 (DFS) 率显著提高。例如，已经将利用对肿瘤相关抗原有反应性的抗体疗法用于阻断特定的细胞过程以减缓疾病进展或者预防疾病复发。尽管近来在乳腺癌治疗上有所进展，但是相当数量的患者最终将死于复发疾病。因此，需要预防或者减缓或者抑制复发疾病的发生的治疗。

疫苗由于易于给药，以及因为他们在感染性疾病中观察到的高成功率而是对此种治疗和预防引人注意的模型。构建癌症疫苗的基本原理在理论上是直接的。然而实践中，有效的实体瘤癌症疫苗的开发仅存有限的成功。

例如，一个尝试给予针对转移性黑色素瘤的肽疫苗的小组仅观察到 2.6% 的客观反应率 (objective response) (Rosenberg SA 等人, (2004) Nat. Med. 10: 909-15)。

对于这一低成功率存在许多可能的解释 (Campoli M 等人, (2005) Cancer Treat. Res. 123: 61-88)。例如，即使抗原与特定类型的肿瘤细胞特异性结合，但该肿瘤细胞可以仅表达低水平的抗原，或者它可以位于隐蔽位点或者屏蔽免疫检测。此外，在肿瘤生长时，它们经常通过使抗原脱落而改变它们的抗原谱。同样影响该低成功率的事实是肿瘤细胞可以表达非常低水平产生免疫应答所需的 MHC 蛋白以及其它的共刺激蛋白。

在晚期癌症患者中存在其它面临针对肿瘤接种疫苗尝试的问题。此种患者趋于具有较大的原发和转移性肿瘤，并且肿瘤内部的细胞由于血流量差而不能触及。这与疫苗策略趋于对恶性血液病治疗更成功的观察相一致 (Radford KJ 等人, (2005) Pathology 37: 534-50; 以及 Molldrem JJ (2006) Biol. Bone Marrow Transplant. 12: 13-8)。此外，当肿瘤变成转移性的，它们可以产生将免疫抑制因子释放到它们的微环境中的能力 (Campoli, 2005; 以及 Kortylewski M 等人, (2005) Nature Med. 11: 1314-21)。转移性肿瘤也已经与外周血淋巴细胞的数量减少以及树突细胞功能障碍相关联 (Gillanders WE 等人, (2006) Breast Diseases: A Year Book and Quarterly 17: 26-8)。

虽然这些因素中的一些或全部可以造成难于开发有效的预防性或治疗性疫苗，但是主要的潜在挑战是多数肿瘤抗原是自体抗原或者与自体抗原具有高度的同源性，并且因此认为其从属于严格的免疫耐受中。因此很明显，许多基于肽的癌症疫苗（具有或没有免疫刺激辅助物）由于低免疫原性以及缺乏特异性而在临床实践上可能注定仅有有限的成功。

在动物实验和乳腺癌患者的临床检测中，基于单抗原的原型乳腺癌疫苗已经略有小成地诱导了可测量的免疫应答。然而，所观察到的免疫应答没有转化成对于通过标准手术和化疗所缓解的疾病再现的临床显著的保护性免疫。因此，需要新型疫苗方法来进一步改善 BCa 患者的复发率以及

总体存活。

优选的疫苗表位是专门由新生瘤所表达的、或者至少在新生瘤中水平增加的那些。HER2/*neu*是许多上皮恶性肿瘤中表达的原癌基因(Slamon DJ 等人, (1989) Science 244: 707-12)。在 20-25%的 BCa 中发现了 HER2/*neu* 蛋白的基因扩增和过表达, 并且其过量存在是不良预后的指征(Pritchard KI 等人, (2006) N. Engl. J. Med. 354: 2103-11)。已经相当广泛地研究了 HER2/*neu*, 并且已从这一蛋白鉴定了若干免疫原性肽。一种该肽称作 E75, 并且对应于 HER2/*neu*的氨基酸 369-377 (SEQ ID NO: 1) (美国专利 No. 6, 514, 942)。

尝试了利用 E75 作为抗癌疫苗, 例如, 作为与不同免疫佐剂组合的单肽疫苗(Zaks TZ 等人, (1998) Cancer Res. 58: 4902-8; Knutson KL 等人, (2002) Clin. Cancer Res. 8: 1014-8; 以及 Murray JL 等人, (2002) Clin. Cancer Res. 8: 3407-18); 载于自体树突细胞上并且重新注入(Brossart P 等人, (2000) Blood 96: 3102-8; 以及 Kono K 等人, (2002) Clin. Cancer Res. 8: 3394- 3400); 或者嵌入能够结合 HLA II 类分子的较长肽中以便募集 CD4 辅助性 T 细胞(Disis ML 等人, (1999) Clin. Cancer Res. 5: 1289-97; 以及 Disis ML 等人, (2002) J. Clin. Oncol. 20: 2624-32)。每种方法都刺激了 E75 特异的细胞毒性 T 细胞介导的免疫应答, 但是在晚期乳腺癌女性中没有显示临床显著的治疗性或保护性免疫。

HER2/*neu*是表皮生长因子受体家族的成员并且编码 185kd 参与调节细胞生长及繁殖的酪氨酸激酶受体(Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosome 17 to bands q12-21.32. Genomics 1989; 4: 362-366; Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. Nat Rev Mol Cell Bio 2001 ; 2: 127-137)。在 25-30%的浸润性乳腺癌 (BCa) 中发现了 HER2/*neu*的过表达和/或扩增并且这与更具攻击性的肿瘤以及更差的临床结果相关联(Slamon DJ, Clark GM, Wong SG 等人, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the

HER-2/*neu* oncogene. Science 1987; 235:177-182; Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA 等人, Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244:707-12; Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30-year follow-up. J Clin Oncol 1992; 10:1044-1048)。

主要通过免疫组织化学(IHC)和荧光原位杂交(FISH)两种检测来进行HER2/*neu*状态的确定。IHC检测HER2/*neu*蛋白的过表达并且以0至3+ (0=阴性, 1+=低表达, 2+=中度, 和 3+=过表达)的半定量标度来报告。另一方面FISH检测HER2/*neu*基因的扩增(过量拷贝)并且以HER2/*neu*基因拷贝数与17号染色体基因拷贝数的比来表示, 如果FISH $\geq$ 2.0个拷贝, 那么解释为“过表达”(Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. Hum Pathol 2005; 36:250-261)。IHC和FISH的一致率约90%。(Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H 等人, Specificity of HercepTest in determining HER-2/*neu* status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol 1999; 17:1533-1541)。将FISH认为是金标准, 因为回顾性分析揭示了它是曲妥珠单抗(Tz)应答的较佳预测; 它是更加客观且可再现的。(Press MF, Slamon DJ, Flom KJ 等人, Evaluation of HER-2/*neu* Gene Amplification and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens. J Clin Oncol 2002; 14: 3095-3105; Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? J Pathol 2003; 199:411-417; Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN 等人, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor

receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 118-145.).

对 HER2/*neu* 作为原癌基因的鉴定和量化使得基于体液或抗体的被动免疫治疗包括了 Tz (Herceptin®) 的使用。Tz 是结合 HER2/*neu* 蛋白的胞外近膜结构域的重组人化单克隆抗体(Plosker GL, Keam SJ. Trastuzumab: A review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer. Drugs 2006; 66: 449-475)。对 HER2/*neu* 过表达 (IHC 3+ 或者 FISH ≥ 2.0)、结阳性 (NP) 以及转移性 BCa 患者指示使用 Tz, (Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D 等人, Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002; 20: 719-726; Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B 等人, Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353: 1659-1672) 且其在具有低至中度 HER2/*neu* 表达的患者中显示出非常有限的活性(Herceptin (Trastuzumab) prescription product insert. South San Francisco, CA: Genentech Inc; 2000.9 修订)。

研究的另一种免疫治疗形式是靶向对于诸如 HER2/*neu* 的肿瘤相关抗原 (TAA) 上的表位的细胞免疫应答的接种疫苗和有效免疫治疗。HER2/*neu* 是若干可以刺激免疫系统以识别并杀死表达 HER2/*neu* 的癌细胞的免疫原性肽的来源。(Fisk B, Blevins TL, Wharton JT 等人, Identification of immunodominant peptide of the HER2/*neu* proto-oncogene recognized by ovarian tumor-specific CTL lines. J Exp Med 1995; 181: 2109-2117.)

E75 (KIFGSLAFL, HER2/*neu*, 369-377) 是 HER2/*neu* 原癌基因家族的肽序列并且作为抗癌疫苗以刺激细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 来破坏癌细胞而用于临床实验 (Zaks, T 等人, Immunization with a peptide epitope (369-377) from HER-2/*neu* leads to peptide specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/*neu*+ tumors. Cancer Research. 58 (21): 4902-8. 1998; Knutson KL, Schiffman K, Cheever

MA 等人, Immunization of cancer patients with HER-2/*neu*, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. Clin Cancer Res 8:1014-1018, 2002; Murray JL, Gillogly ME, Przepiorka D 等人, Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumorlytic CTLs by HER-2 peptide E74 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res 8: 3407-3418, 2002; Avigan D, Vasir B, Gong J, 等人, Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cell cancer induces immunological responses. Clin Cancer Res 2004; 10: 4699-4708; Disis ML, Gooley TA, Rinn K 等人, Generation of T-cell immunity to the HER2/*neu* protein after active immunization with UER2/*neu* peptide-based vaccines. J Clin Oncol 2002; 20: 2624-32; Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR 等人, Generation of immunity to the HER-2/*neu* oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. Clin Cancer Res 5:1289-1297, 1999)。

基于 HER2/*neu* 原癌基因的靶向被动免疫治疗主要围绕 Tz (Herceptin®) 的使用来考虑。Tz 是结合 HER2/*neu* 蛋白的胞外近膜结构域的重组人化单克隆抗体。Tz 已被监管机构所批准并被指示用于转移性乳腺癌患者中 HER2/*neu* 过表达 (IHC 3+或 FISH > 2.0) 的治疗以及用于结阳性乳腺癌患者的佐剂设置中。Tz 经历了多次临床试验并且如今常规地用于转移性患者的治疗以及用于具有 HER2/*neu* 过表达的高风险乳腺癌患者的佐剂治疗。然而, Tz 在具有低至中度 HER2/*neu* 表达的患者中显示出有限的活性。因此, 基于之前以 Tz 观察到的结果, 不会期望靶向 HER2/*neu* 的免疫原性肽疫苗对于具有低至中度 HER2/*neu* 肿瘤表达水平的癌症患者有效。

因此, 本领域需要开发 E75 的免疫保护以及治疗潜能以生产疫苗, 该疫苗向临床缓解的乳腺癌患者提供针对疾病复发的可靠的保护。

概述

本发明涉及在乳腺癌临床缓解患者中诱导和维持抗乳腺癌复发的免疫性的方法。该方法包括给予患者有效量的包括药学有效载体以及具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的肽的组合物。可以通过本领域任何适合的方法完成给药, 例如接种或注射, 更具体为皮内注射, 其可以以一次或多次单独剂量来进行。该剂量可以包括相等浓度的肽和免疫佐剂, 可以基本上同时给予, 并且可以在皮肤表面的一个接种位点或者相互分开的位点给予。按月计, 可以给予组合物约三至六次或者更多次直到建立保护性免疫。在一些方面中, 组合物还包括诸如重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的佐剂。

在一些方面中, 该方法还包括给予受试者加强疫苗 (booster vaccine) 剂量, 其包括有效量的包括药学有效载体以及具有 SEQ ID NO: 2 的肽的组合物。一些方面, 加强剂的组合物还包括诸如 GM-CSF 的佐剂。可以通过接种或注射进行加强剂的给药, 并且从那以后可以每 6 或 12 个月给予。

患者可以是任何哺乳动物, 优选人类。某些方面, 人对于血液分型为人白细胞抗原 A2 或人白细胞抗原 A3 的主要的组织相容性抗原是阳性的。其它方面, 人对可测水平的 HER2/*neu* 的表达是阳性的。一些方面, 人低或中度表达 HER2/*neu*。例如, 一些优选的方面, 人具有免疫组织化学 (IHC) 评分为 1+ 或 2+, 和/或荧光原位杂交 (FISH) 评分小于 2.0。其它方面, 人可以具有 IHC 评分高达 3+。其它方面, 人可以是 HER2/*neu* 的过表达者。例如, 一些优选的方面, 人具有免疫组织化学 (IHC) 评分为 3+ 和/或荧光原位杂交 (FISH) 评分大于或等于 2.0。

本发明还涉及用于该发明方法的组合物。该组合物包括可药用的载体, 有效量的具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的肽, 诸如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的佐剂以及优化的免疫方案。一些具体方面, 疫苗组合物的优选的浓度和方案包括: (1) 1 mg/ml 肽和 0.25 mg/ml 佐剂, (2) 0.5 mg/ml 肽和 0.25 mg/ml 佐剂, (3) 0.1 mg/ml 肽和 0.25 mg/ml 佐剂, 以及 (4)

0.5 mg/ml 肽和 0.125 mg/ml 佐剂，各为每月接种，连续 6 个月，然后每年加强接种，持续 3 年或更多年。

附图简要说明

所包含的附图提供对本发明的进一步的理解，并引入组成本说明书的一部分，附图多方面图解本发明，并与说明书一起用于解释本发明的原理。附图中：

图 1 示出了用 E75 接种疫苗的患者经历的最大局部和全身毒性。局部毒性（注射位点的红斑和硬结）是示出对疫苗应答的期望的效果。最常见的 2 级局部毒性是需要药物处理的瘙痒或不适。最常见的全身毒性是骨痛，感冒样症状和疲劳（通常与 GM-CSF 相关）且持续 < 24 小时。两种 3 级全身毒性是舌血管性水肿（第六次接种后）以及骨痛。

图 2 示出在 20 个月中位随访的 Kaplan Meier 无疾病生存曲线。对于 171 位加入的患者，在 20 个月中位随访中，接种疫苗组的复发率为 5.6%，相比之下观察组为 14.2% ($P=0.04$)。接种疫苗组和对照组的无疾病生存率分别为 92.5% 和 77%。

图 3A 和 3B 示出疫苗诱导的 E75 CTL 应答。（A）所有患者的疫苗诱导的 E75-特异性 CTL。CD8+E75-特异的 CTL 的中位水平从接种疫苗前水平（0.39%，0-3.28% 范围内）显著增加至最大水平（1.8，0.4-12.2% 范围内， $P<0.0001$ ），以及接种疫苗后水平（0.70%，0.06-2.91% 范围内， $P=0.002$ ）。特异性 CD8+T 细胞的疫苗接种前水平和长期（6 个月）水平之间没有差别。（B）基于预存在的免疫性的疫苗诱导的 E75-特异性 CTL。具有以及不具有预存在免疫性的患者显示出对于 E75 接种疫苗应答相同的模式，对于两者都得到相似的中位最大水平和接种疫苗后水平。然而，在那些没有预存在免疫性的患者中，二聚体水平从疫苗前到接种疫苗六个月后有显著增加（0.13% [0-0.28% 范围内] 对 0.45% [0-2.68%]， $P<0.0001$ ）。

图 4A 至 4D 示出迟发型过敏反应检测的结果。（A）所有患者接种疫苗后的 DTH。对照 $2.1 \pm 0.5\text{mm}$ ，相比之下，肽 $14.0 \pm 1.4\text{mm}$ ， $P<0.0001$ 。（B）

NN 患者的疫苗前和疫苗后 DTH。盐水对照与肽接种疫苗前没有差异。接种疫苗后，相比于疫苗后对照 ($P < 0.001$) 以及相比于接种疫苗前 E75 DTH ($P < 0.001$)，对 E75 肽的 DTH 应答存在显著增加。(C) 接种疫苗后 DTH，按试验分组。NP 患者比 NN 患者具有显著更大的 DTH 应答 ($17.3 \pm 2.4\text{mm}$ 对 $10.9 \pm 1.5\text{mm}$, $P=0.02$)。这可能是由于 NN 组的中位总疫苗剂量的差异 ($2000\text{ }\mu\text{g}$ 对 $4000\text{ }\mu\text{g}$, $P < 0.0001$)。(D) 接种疫苗后的 DTH，按剂量分组。接受 $< 6000\text{ }\mu\text{g}$ E75 的患者比接受总计 $6000\text{ }\mu\text{g}$ 的患者具有显著更小的 DTH 应答 ($13.3 \pm 1.9\text{mm}$ 对 $25.1 \pm 4.0\text{mm}$, $P=0.008$)。

图 5 示出加强剂患者中的 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞水平。在初次接种疫苗系列后 6 个月接受加强剂的患者比自初次接种疫苗系列 > 6 个月接受加强剂的患者具有显著更高的 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞水平。在那些 > 6 个月的患者中，他们显示了从自己初次接种疫苗后 6 个月时的水平 0.7 非显著性下降至 0.44%。

图 6 示出了分级的局部和全身毒性。大多数患者经历了 1 级局部毒性而只有两位患者经历了 2 级局部毒性。半数以上的患者没有全身毒性并且没有 2 级或 3 级全身毒性。经历 1 级全身毒性的 11 位患者包括(实例数)：疲劳(4)，头痛(4)，肌痛(3)，寒战(2)，发热(2)，腹泻(1)，不适(1)，骨痛(1)以及关节痛(1)。

图 7 示出缺乏 SRI 的患者的加强剂应答显示出抗原特异性 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞数量增加的趋势。

图 8 示出由酶联免疫吸收检测显示有增加的分泌 $\text{IFN-}\gamma$ 的细胞的患者。总体上，91% 的患者显示出由 ELISPOT 所测量的增加的抗原特异性(功能性) T 细胞，50% 显示出明确的增加 ($\geq 50\%$ 的检测中分泌 $\text{IFN-}\gamma$ 的细胞增加)。

图 9 示出加强剂患者的局部反应。时间上接受加强剂更接近完成他们初次接种疫苗系列 (≤ 9 个月；浅条) 的患者比那些自他们初次接种疫苗系列 > 9 个月的患者具有显著更大的 LR。两组在初次系列最后具有相似的 LR (左侧)。这些数据表明加强剂在较早接受加强剂的患者中的加性效应以及在较晚接受加强剂的患者中的维持效应。

图 10 示出了初次系列过程中 LR 的增加, 并且说明了两组在初始系列是相同的以及唯一区别是距离初次系列的时间。Vax 6 的数与图 7 示出的之前最终 LR 是不同的, 因为一些患者只接受了 4 次接种。除了在 ≤ 9 个月组第三次接种 (vax 3) 的值更大 (97 对 80, $p=0.04$), 两组在所有点都是统计学上相同的。

图 11A 至图 11D 示出加入 E75 II 期试验的患者免疫 (平均值 $\pm$ SE) 和临床应答 (绝对复发和死亡率), 按 HER2/*neu* LE 对 OE 表示。

A. 体外免疫应答-所有体外接种前-最大%特异的 CD8+T 细胞统计学上增加 (LE $p < 0.001$, OE $p < 0.001$), LE 患者相比于 OE 患者具有增加的最大应答 ($p=0.04$)。

B. 体内免疫应答-所有体内接种前-接种后 DTH 统计学上增加 (LE $p < 0.001$, OE $p=0.02$)。

C. 复发率-接种疫苗的 LE 和 OE 患者中复发率降低, 尽管并非统计学上显著的。

D. 死亡率-接种疫苗的 LE 患者具有趋于死亡率降低的倾向 ($p=0.08$)。

图 12A 至图 12D 示出加入 E75 II 期试验的患者的免疫 (平均值 $\pm$ SE) 和临床应答 (绝对复发和死亡率), 按 HER2/*neu* IHC 表达水平 (0, 1+, 2+, 3+) 表示。

A. 体外免疫应答-所有体外接种前-最大%特异的 CD8+T 细胞统计学上增加, 而只有 HER2/*neu* 1+接种前-长期趋于有显著性 ($p=0.08$)。

B. 体内免疫应答-所有体内接种前-接种后 DTH 统计学上增加 (0 $p=0.03$, 1+ $p=0.02$, 2+ $p=0.02$, 3+ $p=0.05$)。

C. 复发率-所有接种疫苗的 IHC 水平中复发率降低, 尽管并非统计学上显著的。

D. 死亡率-所有接种疫苗的 IHC 水平的死亡率降低, 并且在 HER2/*neu* IHC 1+疫苗患者中是统计学上显著的 ($p=0.04$)。

图 13A 和 13B 示出二聚体检测和 DTH (每 ODG 对 SDG)。(A) 在疫苗前 CD8+E75-特异性 T 细胞平均水平中看到 ODG 对 SDG 的显著差异

($0.91 \pm 0.13\%$ 对 $0.54 \pm 0.11\%$, $p=0.03$)。在最大 CD8+E75-特异性 T 细胞平均水平之间没有看到显著差异。最适剂量示出 CD8+E75-特异性 T 细胞的每月接种疫苗后平均值百分数趋于增加的倾向 ($0.87 \pm 0.10\%$ 对 $0.67 \pm 0.05\%$, $p=0.07$)。在 6 个月时组间长期 CD8+E75-特异性 T 细胞平均水平中没有看到差异。(B) ODG 对 SDG 之间正交平均 DTH 应答 (mm) 没有显示出与对照接种物的差异 ($3.0 \pm 1.1\text{mm}$ 对 $2.0 \pm 0.5\text{mm}$)。在 ODG 对 SDG 中, DTH 对肽的应答显著升高 ($21.5 \pm 2.5\text{mm}$ 对 $11.3 \pm 1.3\text{mm}$, $p=0.00021$)。

图 14 示出 SDG 和 ODG 之间临床复发率的比较。与 SDG 相比, ODG 证明了趋于有较低复发率 ($p=0.27$) 但显著较短中位随访的趋势。然而, ODG 由患有明显更攻击性疾病的更年轻的患者所组成。

详细说明

将多种涉及本发明方法和其它方面的术语用于本说明书和权利要求通篇。除非另有指明, 否则以本领域普通含义给出该术语。对于其他特别定义的术语, 以与此处提供的定义相一致的方式来解释。

术语“预防”指通过任何客观或主观参数 (包括放射学的或身体检查的结果) 所测量, 在临床缓解的患者中预先阻止乳腺癌复发 (recurrence) / 复发 (relapse) 的任何成功或该成功的任何象征。

“有效量”或“治疗有效量”在此互换使用, 并且指如在此所描述的对于实现特定生物学结果有效的化合物、物质或组合物的量, 该生物学结果例如但不限于在此公开、描述或示例的生物学结果。该结果可以包括但不限于由适于本领域的任何方法所测定的乳腺癌的预防, 并且更具体地, 复发乳腺癌的预防, 例如受试者中复发的预防。最佳治疗量指实现最佳治疗结果的剂量、方案和加强剂的使用。

“可药用的”指鉴于组合物、制剂、稳定性、患者接受以及生物可利用性的角度, 从药学/毒理学观点讲, 患者可接受的那些特性和/或物质, 以及从物理/化学观点讲, 对从事制造的药剂师而言可接受的那些特性和/或物质。“可药用载体”指不干扰活性成分的生物活性的效力并且对于其

给予的宿主没有毒性的介质。

“保护性免疫”或“保护性免疫应答”意指受试者建立了对于抗原如在此描述和示例的乳腺癌抗原的免疫原性组分的活性免疫应答，以致在随后暴露于该抗原时，受试者的免疫系统能够靶向并破坏表达该抗原的细胞，从而减少受试者癌症复发的发病率和死亡率。本发明上下文中的保护性免疫优选由T淋巴细胞所赋予，但不排除其它。

术语“约”当在此用于指可测值例如量、持续时间等时意指包含与该特定值有 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ ，更优选 $\pm 5\%$ ，甚至更优选 $\pm 1\%$ ，且还更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化，该变化对于进行所公开的方法是适当的。

“肽”指任何包括通过肽键或修饰肽键（即肽电子等排体）相互连接的两个或多个氨基酸。多肽指短链（通常称作肽、寡肽或寡聚物）和较长链（通常称作蛋白质）。多肽可以含有除20种基因编码的氨基酸以外的氨基酸。多肽包括通过天然加工（例如翻译后加工）或通过本领域众所周知的化学修饰技术所修饰的氨基酸序列。此种修饰在基础课本中被充分地描述并且在专著以及很多的研究文献中被更加详细地描述。修饰可以在多肽的任何位置发生，包括肽骨架、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。应理解的是在给定多肽的若干位点处，可以以相同或不同程度存在相同类型的修饰。给定多肽也可以含有许多类型的修饰。作为遍在蛋白化的结果，多肽可以分支，并且他们可以是带有或不带有分支的环形。环形、分支以及分支的环形多肽可以由天然翻译后加工或者可以由合成方法所产生。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素共价结合、血红素部分的共价结合、核苷酸或核苷酸衍生物的共价结合、脂或脂衍生物的共价结合、磷脂酰肌醇的共价结合、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化（selenoylation）、硫酸化、转运RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加例如精氨酰化（arginylation），和遍在蛋白化。

“加强剂”指给予患者以增强、延长或维持保护性免疫以及克服由调

节 T 细胞介导的 T 细胞应答下调的剂量免疫原。

“无乳腺癌”或者“无疾病”或者 NED（无疾病证据）意指患者处于由目前标准护理疗法的治疗所引起的临床缓解。对于同义使用的“缓解”或“临床缓解”，其意指根据临床诊断，乳腺癌的临床体征、放射学体征以及症状已经显著减少或者完全消失，尽管癌细胞仍旧可能存在于体内。因此，认为缓解包括部分和完全缓解。残留癌细胞的存在可以通过诸如 CTC（循环肿瘤细胞）检测法来计算并且可以预测复发。

“复发(Relapse)”或“复发(recurrence)”或“再现(resurgence)”在此互换使用，并且指在一段时间的改善或缓解后，乳腺癌的复发的放射照相诊断，或者复发的体征和症状。

乳腺癌是世界范围女性主要的健康关注。迄今尝试的乳腺癌疫苗效力有限，尤其是对于预防无疾病患者的复发。根据本发明，确定了无疾病患者中乳腺癌的复发可以通过在某些情况下，向患者给予 HER2/*neu* 原癌基因的肽 E75 (SEQ ID NO: 2) 而得到有效预防。也出乎意料地确定了 E75 肽与 MHC HLA-A2 和-A3 相关，并因此可以诱导具有 HLA-A2 和-A3 单元型的患者的保护性免疫。

因此，本发明涉及诱导针对乳腺癌复发的保护性免疫的疫苗组合物。本发明也涉及诱导及维持针对乳腺癌的保护性免疫的方法，并且更具体的针对复发的乳腺癌。一些方面，本方法包括向受试者给予有效量的包括药学有效的载体和具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多肽的组合物。SEQ ID NO: 2 的变体包括具有如美国专利公开号 NO. 20050169934 所描述的具有修饰的氨基酸侧链的那些，其适于在本发明的疫苗组合物和方法中用作免疫原。

受试者可以是任何动物，并且优选哺乳动物例如人类、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猴、牛、马、猪等。最优选人。高度优选的方面，人类对于 HLA-A2 或 HLA-A3 单元型是阳性的。其它优选的方面，人类对于人 HER2/*neu* 的表达是阳性的，优选包括具有低和/或中度表达 HER2/*neu* 的肿瘤的人类，以及作为 HER2/*neu* 的过表达者的人类。

可以根据适于本领域的任何方法以冻干或液体制剂来配制疫苗组合物。液体形式制剂的非限制性实例包括溶液、悬剂、糖浆剂、浆液和乳剂。适合的液体载体包括任何适合的有机或无机溶剂,例如水、醇、盐水溶液、缓冲的盐水溶液、生理盐水溶液、葡萄糖溶液、丙二醇水溶液等,优选无菌形式。

可以以中性或盐形式配制疫苗组合物。可药用的盐包括酸加成盐(由活性多肽的游离氨基形成)、及由无机酸(例如盐酸或磷酸)或者有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、苦杏仁酸)等形成。由游离羧基形成的盐也可以源自无机碱例如钠、钾、铵、钙、或者铁的氢氧化物,以及如异丙胺、三甲基胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱。

优选配制疫苗组合物用于接种或注射受试者。对于注射,本发明的疫苗组合物可以配制为水性溶液如水或醇,或者生理上相容的缓冲液如Hank's溶液、Ringer's溶液或生理盐水缓冲液。该溶液可以含有配方剂如悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。可以以固体形式制剂来制备注射制剂,该固体制剂旨在于例如使用前通过适合的介载体如无菌水、盐水溶液或醇构建er于使用前不久转化成适于注射的液体形式制剂。

也可以以缓释介载体或缓释剂配制疫苗组合物。可以通过接种或植入(例如皮下或肌肉内)或通过注射给予此长效的制剂。因此,例如可以用适合的聚合材料或疏水材料(例如作为可接受的油中的乳液)或离子交换树脂,或者作为略溶的衍生物(例如作为略溶的盐)配制疫苗组合物。脂质体和乳剂是适合用作载体的递送介载体的公知实例。

疫苗组合物可以包括增强疫苗保护效力的试剂,例如佐剂。佐剂包括作用于增加对E75肽抗原的保护性免疫应答,从而降低疫苗中所需抗原量、和/或产生保护性免疫应答所需给药频率的任何化合物或多种化合物。佐剂可以包括例如乳化剂、胞壁酰二肽、阿夫立定(avridine)、水性佐剂如氢氧化铝、基于壳聚糖的佐剂、和本领域已知的多种皂苷、油及其他物质中的任一,例如爱菲金(Amphigen)、LPS、细菌细胞壁提取物、细菌DNA、CpG序列、合成的寡核苷酸及其组合(Schijns等人,(2000) Curr. Opin.

Immunol. 12: 456)、草分枝杆菌 (*Mycobacterium phlei* (*M. phlei*)) 细胞壁提取物 ((MCWE) (美国专利 No. 4, 744, 984))、草分枝杆菌 (*M. phlei*) DNA (M-DNA) 和 M-DNA-*M. phlei* 细胞壁复合物 (MCC))。可以用作乳化剂的化合物包括天然和合成的乳化试剂, 以及阴离子、阳离子和非离子化合物。合成的化合物中, 阴离子乳化试剂包括例如月桂酸和油酸的钾、钠和铵盐, 脂肪酸的钙、镁和铝盐, 以及有机磺酸盐如硫酸月桂酯钠。合成的阳离子试剂包括例如十六烷基三甲基溴化铵, 而合成的非离子试剂示例为甘油酯 (例如单硬脂酸甘油酯)、聚乙二醇酯和醚, 以及山梨糖醇酐脂肪酸酯 (例如山梨糖醇酐单棕榈酸酯) 及其聚氧乙烯衍生物 (例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单棕榈酸酯)。天然乳化试剂包括阿拉伯胶、明胶、卵磷脂和胆固醇。

可以由油组分, 例如单一油、油混合物、油包水乳液或水包油乳液来形成其他适合的佐剂。油可以是矿物油、植物油或动物油。矿物油是通过蒸馏技术获自矿脂的液体碳氢化合物, 并且本领域也称作液体石蜡、液体矿脂或石蜡油。适合的动物油包括例如鱼肝油、大比目鱼油、鲱鱼油、罗非鱼油和鲨鱼肝油, 其全部是市售可得的。适合的植物油包括例如芥花籽油、杏仁油、棉籽油、玉米油、橄榄油、花生油、红花油、芝麻油、豆油等。Freund's 完全佐剂 (FCA) 和 Freund's 不完全佐剂 (FIA) 是通常用于疫苗制剂的两种常见佐剂, 并且也适合用于本发明。FCA 和 FIA 都是矿物油包水乳液; 然而, FCA 也含有灭活的分枝杆菌属 (*Mycobacterium* sp.)。

也可以将免疫调节细胞因子用于疫苗组合物以增强疫苗效力, 例如作为佐剂。该细胞因子的非限制性实例包括干扰素 α (IFN- α), 白介素-2 (IL-2), 以及粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 或其组合。GM-CSF 是高度优选的。

可以使用本领域熟练技术人员公知的技术, 包括但不限于混合、超声法和微流化 (microfluidation) 来制备包括 E75 肽抗原以及还包括佐剂的疫苗组合物。佐剂可以组成约 10% 至约 50% (v/v) 的疫苗组合物, 更优选约 20% 至约 40% (v/v), 并且更优选约 20% 至约 30% (v/v), 或者这些范

围内的任何整数。高度优选约 25% (v/v)。

可以通过灌注或注射（例如静脉内、肌肉内、皮内、皮下、鞘内、十二指肠内、腹膜内等）给予疫苗组合物。也可以鼻内、阴道、直肠、口服或经皮给予疫苗组合物。此外，可以通过“无针”递送体系给予疫苗组合物。优选地，通过皮内注射给予该组合物。可以在医生或医生助理的指导下给药。

注射可以分成多次注射，此种分开接种优选地基本上同时给药。当作为分开接种给药时，免疫原的剂量优选在每个单独的注射中等分，但也非必须。如果疫苗组合物中存在佐剂，佐剂的剂量优选在每个单独的注射中等分，但也非必须。用于分开接种的单独的注射优选在患者身体上彼此基本上邻近的给予。一些优选的方面，在身体上彼此至少隔开约 1cm 给予注射。一些优选的方面，在身体上彼此至少隔开约 2.5cm 给予注射。高度优选的方面，在身体上彼此至少隔开约 5cm 给予注射。一些方面，在身体上彼此至少隔开约 10cm 给予注射。一些方面，在身体上彼此隔开大于 10cm 给予注射，例如在身体上彼此隔开约 12.5、15、17.5、20cm 或者更多。初次免疫注射和加强剂注射可以按照在此所述和示例而作为分开接种给予。

可以使用多种可选的药物递送体系。此种体系的非限制性实例包括脂质体和乳剂。也可以使用某些有机溶剂如二甲基亚砷。此外，可以使用缓释体系，例如含有治疗剂的固体聚合物的半渗透基质来递送疫苗。多种可用的缓释材料是本领域技术人员熟知的。缓释胶囊可以根据它们的化学性质在若干天到若干周到若干月的范围内释放疫苗组合物。

为了预防处于乳腺癌缓解的患者乳腺癌复发，将治疗有效量的疫苗组合物给予受试者。如以本领域中的任何适合方法所测量，治疗有效量将在患者中提供 E75 特异性细胞毒性 T-淋巴细胞 (CD8⁺) 数量的临床显著增加，以及对于该抗原的细胞毒性 T 淋巴细胞应答的临床显著增加。总体上，患者中，治疗有效量的疫苗组合物将破坏残留的微观疾病并且显著降低或消除患者中乳腺癌复发的风险。

疫苗组合物的有效量可以取决于任何数量的变量，包括但不限于患者

的物种、品种、体型、高度、重量、年龄、总体健康、制剂类型、给药模式或方式、或者是否存在显著增加患者复发乳腺癌的可能性的风险因素。此风险因素包括但不限于手术类型、淋巴结状态和阳性数量、肿瘤大小、肿瘤组织学级别、激素受体（雌激素和孕酮受体）存在与否、HER2/*neu*表达、淋巴血管浸润以及遗传倾向性（BRCA 1 和 2）。一些优选的方面，有效量取决于患者是淋巴结阳性或淋巴结阴性，并且如果患者是淋巴结阳性，则取决于阳性结的数量和程度。所有情况下，本领域技术人员可以使用常规优化技术和医师熟练且知情的判断以及其它对于本领域技术人员显而易见的因素来常规确定适当的有效量。优选地，在此描述的疫苗组合物的治疗有效量将对受试者提供治疗预防益处而不造成实质毒性。

可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药学方法（例如用于测定 LD50（群体中 50%致死的剂量）和 ED50（群体中 50%治疗有效的剂量）的方法）来确定疫苗组合物的毒性和治疗效力。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数并且它可以表示为 LD50/ED50 比率。优选显示高治疗指数的疫苗组合物。可以将获自细胞培养物检测和动物研究的数据用来配制用于患者的剂量范围。此疫苗组合物的剂量优选处于包括具有少量或没有毒性的 ED50 的循环浓度范围内。可以根据所用剂型以及使用的给药途径在此范围内改变剂量。

可以使用毒性信息以更加准确地确定对特定受试者如人的有用剂量。治疗医生可以由于毒性或器官功能障碍而终止、中断或调整给药，并且如果临床应答不足，可以按需要调整治疗来提高应答。预防复发乳腺癌的给药剂量数量将随患者病情的严重性、复发的相对风险或者给药途径等等因素而变化。患者病情的严重性可以例如部分通过标准预后评估方法来评估。

可以以任何适于诱导和/或维持针对乳腺癌复发的保护性免疫，并且更具体地，诱导和/或维持对 E75（SEQ ID NO: 2）的细胞毒性 T 淋巴细胞应答的方案向患者给予疫苗组合物。例如，可以按在此所述和示例向患者给予疫苗组合物作为初次免疫，随后给予加强剂以增强和/或维持保护性免疫。

一些方面，可以每月 1 次、2 次或更多次向患者给予疫苗组合物。优选每月一次连续 6 个月以建立保护性免疫应答，尤其对于初次免疫方案。一些方面，可以在初次免疫方案完成后，以常规间隔如每 6 个月或更多个月给予加强剂。加强剂的给药优选为每 6 个月。也可以视需要给予加强剂。

只要患者需要，可以持续疫苗给药方案，包括初次免疫和加强剂给药，例如在若干年的疗程中，至患者终生。一些方面，疫苗方案包括在疫苗方案初始更频繁的给药，以及包括随着时间而较不频繁的给药（如加强剂）以维持保护性免疫。

可以在疫苗方案初始以较低剂量给予疫苗，而随着时间的增加以较高剂量给予。也可以在疫苗方案初始以较高剂量给予疫苗，而随着时间的增加以较低剂量给予。可以修改和/或调整初次疫苗和加强剂给药的频率以及给予的 E75 的剂量以满足个别患者的特别需要，由给药医生根据本领域的任何适合方法所确定。

一些方面，疫苗组合物（包括作为加强剂给药的组合物）包括约 0.1mg 至约 10mg 的 E75 肽。一些优选的方面，该组合物包括约 0.5mg 的 E75。一些优选的方面，该组合物包括约 2mg 的 E75。一些优选的方面，该组合物包括约 1mg 的 E75。

一些优选的方面，包括 E75 的组合物（包括有作为加强剂给药）的疫苗组合物还包括 GM-CSF。此组合物优选包括约 0.01mg 至约 0.5mg 的 GM-CSF。一些优选的方面，该组合物包括约 0.125mg 的 GM-CSF。一些优选的方面，该组合物包括约 0.25mg 的 GM-CSF。

一些特别优选的方面，疫苗组合物在总共 1ml 体积中包括 1mg 的 E75 肽以及 0.125 至 0.250mg 的 GM-CSF，并且以每份 0.5ml 的分开接种来每月给予，通过在患者身体上隔开约 5cm 注射给予，同时或混合给予。给药方案优选为每月给药持续 6 个月。约 48 小时的时间后，可以对注射位点评估红斑和硬结的局部反应。如果在两位点的反应汇合并且总硬结面积测量值 > 100mm²（或者患者感受到任何 > 2 级的全身毒性），那么可以减少 GM-CSF 的剂量，例如减半，尽管预期肽剂量保持不变。如果患者在随后剂量上表

现出强烈 (robust) 的反应, 那么可以进行 GM-CSF 的进一步减少, 例如减半。如果患者没有表现出强烈的反应, 那么可以继续以较高 GM-CSF 剂量给予患者。一些方面, 类似地确定给药方案和加强剂的剂量, 开始用包括 1mg E75 和 0.25mg GM-CSF 的疫苗组合物、在初次免疫疫苗方案结束后约每六个月给予加强剂。

下面仅仅出于说明的目的, 提供进行本发明的具体实施例的示例性方面, 这并不旨在以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1

患者选择

结阳性 (NP) 和结阴性 (NN) 试验得到地方伦理审查委员会 (Institutional Review Boards) 批准并且作为试验性新药应用 (BB-IND#9187) 在 Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC 以及 Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA 进行。所有患者都在组织学上证实患有乳腺癌 (BCa), 并在加入前 (按照需要) 完成了手术、化疗和放疗的标准程序。激素治疗的患者继续他们的特殊方案。经过适当的咨询并同意后, BCa 患者加入适当的试验 (NP 或 NN), 然后经 HLA 分型, 因为 E75 主要结合在大约 40-50% 的一般群体中发现的 HLA-A2。疫苗接种 HLA-A2⁺ 患者, 并且前瞻性地观察 HLA-A2⁻ 患者的临床复发。HLA-A3⁺ 患者加入 A2 患者的平行试验, 并在加入时以有效剂量方案治疗。在接种疫苗前, 用一组回忆抗原 (腮腺炎、破伤风和假丝酵母 (Candida)) 对患者进行皮肤测试。如果患者对两种以上抗原有反应 (>5 mm), 则认为他们是具免疫能力的。

总计 186 位患者加入此二种 E75 疫苗试验 (NP=95, NN=91), 患者在标准治疗后为无疾病, 但有高复发风险。在 HLA-A2⁺ 之后, 随后是 HLA-A3⁺, 用疫苗接种患者 (n=101) (49 NP 和 52 NN; 90 HLA-A2⁺ 和 11 HLA-A3⁺)。将所有其他患者 (n=85) 分配为观察。将 5 名疫苗患者和 4 名观察患者退出该研究, 但无一人是出于毒性原因。因此, 96 名疫苗接种患者和 81 名

观察患者可用于分析。表 1 呈现了两组的人口统计学和预后因子。

表 1. 接种患者和观察患者的人口统计学和预后因子。

	接种疫苗的, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=96) [†]	观察的, HLA-A2 ⁻ , A3 ⁻ (n=81) [‡]	P
中值年龄, 年	58.9	55.1	0.33
范围, 年	32-80	34-87	
种族			0.12
白, %	89.6	81.5	
其它, %	10.4	18.5	0.20
肿瘤大小			
T1, %	69.8	60.5	0.20
T2-T4, %	30.2	39.5	
组织学分级			0.50
I-II, %	64.5	59.5	
III, %	35.5	40.5	0.19
结阳性, %	46.9	56.8	
结阳性中位数(仅 NP)	2.0	2.5	0.17
范围	1-25	1-15	
HER2/neu IHC 3+ or FISH +, %	25.8	28.4	0.32
激素受体阴性, %	31.6	17.3	
XRT, %	71.9	80.2	0.03
化学预防, %	65.6	78.8	
佐剂赫赛汀, %	5.2	3.7	0.60

[†]101 位患者加入疫苗组 (vaccine arm), 2 位转为观察, 1 位由于佐剂曲妥珠单抗退出, 1 位由于长期的不相关疾病退出, 以及 1 位由于个人原因退出。

[‡]85 位患者加入观察组, 2 位失去随访, 4 位退出我们的 MHC II 肽疫苗试验。自疫苗组得到两位患者。

在最标准的预后分类中, 这两组是相等的。然而, 更多的疫苗接种患者为激素受体阴性, 并因此, 在疫苗组中较少患者进行辅助激素治疗。对于个体试验, NN 试验中的更多疫苗接种患者相比于对照具有过表达

HER2/*neu*的肿瘤(25.0%对7.1%, $P<0.05$), 且较少患者接受了辅助放射治疗(64.7%对85.7%, $P<0.05$)。

在试验期间, 基于从两种常用的 HLA-肽结合算法: BIMAS (SEQ ID NO: 3) 和 SYFPEITHI (SEQ ID NO: 4) 获得的结合亲和数据, 确定了 E75 可用于 HLA-A3⁺患者。另外, 临床前期评估表明, E75 刺激的 HLA-A3⁺CTL 能够裂解表达 HLA-A3⁺ HER2/*neu*的癌细胞(未示出)。

尽管相比于 HLA-A2 小组, HLA-A3 小组的结状态并无差异(54.5%对45.9%, $P=0.59$), 但是 HLA-A3 小组倾向于具有较小的肿瘤(90.9%T1 对65.7%, $P=0.08$), 较不可能具有激素不敏感性肿瘤(18.2%对29.6%, $P=0.4$), 且具有较少的过表达 HER2/*neu*的肿瘤(0%对31.5%, $P=0.028$)。

实施例 2

接种疫苗和临床方案

E75 肽由 NeoMPS, Inc. (San Diego, CA) 以优良药品制造标准 (GMP) 级别商业化生产。由高效液相色谱和质谱验证肽纯度 (>95%), 且由氨基酸分析确定氨基酸含量。由制造商进行无菌和综合安全测试。在无菌盐水中以 0.5ml 中 100 μ g、500 μ g、或 1000 μ g 的冻干肽复溶。给药时, 解冻肽并与 GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) 以 0.5ml 混合, 将 1.0ml 接种物分为两份, 在间隔 5cm 的两位点皮内给予。所有的接种都以相同的非常手段给予。

疫苗接种系列。将 NP 试验设计为两步安全试验, 初始阶段肽剂量升高, 随后阶段方案改变。以前已公开了疫苗系列的细节 (Peoples GE 等人, (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536-45)。简言之, 将 3-6 位患者 (HLA-A2⁺或 HLA-A3⁺) 各指定为接受 4 或 6 次每月 100 μ g、500 μ g、或 1000 μ g 的 E75 注射 (分别为 100.6、500.4、500.6、1000.4 和 1000.6) (表 2)。为了确定和确认在最后一剂量组中占较大患者数量的 NP 患者中的最佳剂量, 最终扩大了组。

表 2. NP 和 NN 试验设计

患者组	患者数 HLA-A2 ⁺ (A3 ⁺)	肽剂量 [†] (μg)	GM-CSF dose [†] (μg)	疫苗接种后 月数 [‡]
结阳性				
100.6	2 [*]	100	250	0,1,2,3,4,5
500.4	6	500	250	0,1,2,5
500.6	6	500	250	0,1,2,3,4,5
1000.4	9 (2)	1000	250	0,1,2,5
1000.6	16 (4)	1000	250	0,1,2,3,4,5
结阴性				
500.125.3	10	500	125	0,1,5
500.125.4	10	500	125	0,1,2,5
500.250.4	10 (3)	500	250	0,1,2,5
500.250.6	10 (2)	1000	250	0,1,2,3,4,5
1000.250.6	6	1000	250	0,1,2,3,4,5
总计	85 (11)			

[†]将肽悬于 0.5ml 灭菌盐水中并与 GM-CSF 和灭菌盐水组合至每接种物的终体积为 1.0ml

[‡]每 3-4 周给予疫苗

^{*}一位分配给 100.6 组的患者退出，并且在该剂量组没有指派替代者

通过改变 GM-CSF 的剂量以及改变接种方案，设计了 NN 试验以进一步描绘最佳生物学剂量。这一试验允许具有不表达 HER2/*neu* 的肿瘤的患者参加以确定接种假定为首次接受抗原 (antigen-naïve) 的宿主的可行性。每个剂量组分配 10 位患者在 5 个月中接受 3、4 或 6 次的每月注射 (表 2)。

外周血单核细胞 (PBMC) 的分离和培养。在每次接种疫苗前、疫苗系列完成 1 个月 (疫苗后) 和六个月 (长期) 后抽血。抽出 50ml 血液并分离 PBMC。洗涤 PBMC 并在培养基中重悬，并用做淋巴细胞来源。

毒性。接种疫苗后 1 小时观察患者的速发型超敏反应，并且患者在 48-72 小时后返回以测量他们的注射位点，并接受毒性询问。通过用于 Adverse Events 3.0 版本的 NCI Common Terminology criteria 将毒性分级，并以 0-5 的标度报告。只有在较低剂量组中没有明显毒性产生时，才

从一个剂量组升级至下一个剂量组。根据在连续接种期间发生的最大局部和全身毒性来报告患者特异的结果。

局部和全身毒性是温和的，且所有患者都完成了疫苗系列。局部毒性为1级（81%）和2级（19%）。全身毒性是极小：0级（12%），1级（71%），2级（14%）和3级（2%）（如图1），没有观察到4级和5级全身毒性。由于观察到的毒性与GM-CSF相一致，所以在明显的局部或全身反应（18.7%的患者）的情况下，制定GM-CSF剂量减少50%。

A3患者的毒性谱与A2对应患者相同：对于两组，均为最大局部毒性1级（82%）和2级（18%）。最大的全身毒性（A3对A2）：0级（0%对15%），1级（92%对68%），2级（8%对14%），3级（0%对2%； $p=0.4$ ）。在各自剂量组，A3患者与A2患者的局部反应相同。因此，对比HLA-A2⁺患者，HLA-A3⁺患者间的毒性谱并无差异，且局部反应同样强烈。相比于18%，2级局部毒性分别为20%，表明了相似的体内免疫原性。

临床复发。按照由患者的主要肿瘤科医生所述的护理癌症标准筛查，对所有患者观察临床复发。若经活组织切片检查证实，或由主要的肿瘤科团队对复发进行治疗，则认为该患者复发。

按照方案设计，在18个月中位随访开始初步分析。在这一分析完成时，171位患者加入，且在20个月的中位随访时，相对于观察组14.2%的复发率，接种疫苗组的复发率为5.6%（ $P=0.04$ ）。在接种疫苗和对照组中，无疾病生存率分别为92.5%和77%（图2）。观察组中有4人死亡（总存活[OS]为95.1%），相比之下，接种疫苗组中只有1人死亡（[OS] 99%， $P=0.1$ ）。

尽管该方案设计中免疫性逐渐减小且缺乏加强剂接种，但是两组试验的随访仍延长至5年。记载了两组中额外的复发的更新分析包括在58个月时疫苗组中的晚期复发。在26个月的中位随访中，有186位患者加入，并且疫苗组的复发率为8.3%，相比之下观察组为14.8%（ $P=0.15$ ）。这些患者中存在不同的复发分布。对照患者中，仅位于骨的复发的占到复发的50%（6/12），而接种疫苗的复发患者为0%（ $P=0.04$ ）。

HLA-A3⁺患者中，复发率与HLA-A2⁺患者相似（9.1%对8.2%）。

统计分析。使用 Kaplan-Meier 方法的生存分析比较组间的复发率，以及使用 log-ranked 分析比较复发受试者的比例。酌情使用 Wilcoxon、Fisher's 精确检验或者 χ^2 计算临床病理因素的 P 值。使用 Wilcoxon 计算用于比较接种疫苗前和接种疫苗后的二聚体水平的 P 值，而对于 DTH 则使用 Student's t 检验。

实施例 3

HLA-A2: 免疫球蛋白二聚体检测

使用二聚体检测法直接评估患者新分离的 PBMC 中的 CD8⁺ E75 特异细胞的存在。简言之，通过用过量 (5 μ g) 的肽和 0.5 μ g 的 β 2 微球蛋白 (Sigma, St. Louis, MO) 在 37°C 过夜孵育 1 μ g 二聚体而令 HLA-A2: 免疫球蛋白 (Ig) 二聚体 (PharMingen, San Diego, CA) 荷载 E75 或对照肽 (E37, 叶酸结合蛋白 (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID NO: 5))，然后在 4°C 储存至使用。洗涤 PBMC 并在 PharMingen 染色缓冲液 (PharMingen) 中重悬，并在 5 ml 圆底聚苯乙烯试管 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 中以 5×10^5 个细胞/100 μ l/管添加，并用荷载的二聚体和抗体染色。测定每位患者中应答各相继疫苗接种的 CD8⁺ E75 特异细胞的水平，并且对每位患者将所有的接种后测量值平均化，并与他们接种前的水平进行比较。

在每次接种疫苗前以及在第一个月（接种疫苗后）和六个月（长期）通过二聚体检测法在新鲜的离体 PMBC 中评估 E75-特异的 CTL。之前已经显示了二聚体检测法与功能性免疫检测法（细胞毒性和细胞因子分泌）相关联 (Peoples GE 等人, (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536-45)。观察到 CD8⁺ E75 特异的 CTL 在疫苗系列期间渐增、达峰值、随后再完成时减弱到平台的模式。

图 3A 示出了所有患者的累积的二聚体反应。中位 CD8⁺ E75-特异的 CTL 从疫苗前到接种疫苗后以及到峰水平存在统计学上显著的增加。长期水平与接种疫苗前水平没有不同。接种疫苗后 6 个月，只有 48.3% 的患者维持了显著的残留免疫性（定义为二聚体 > 0.5）。

在 42.7%患者中发现了对于 E75 的预存在免疫性(定义为二聚体 > 0.3)。不论初始二聚体水平如何,观察到相同的二聚体应答模式。然而,缺少预存在免疫性的患者在他们长期二聚体水平上具有显著增加。

实施例 4

迟发型过敏反应 (DTH)

两种试验中,在按前述在完成疫苗系列后 1 个月,用 0.5ml 普通盐水中 $100\mu\text{g}$ 的 E75 (没有 GM-CSF) 来评估 DTH 反应,用 0.5ml 普通盐水作为体积对照 (Peoples GE 等人, (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536-45)。使用敏感圆珠笔法 (sensitive ballpoint-pen method) 在 48-72 小时二维测定 DTH 反应,正交平均值报告并与对照对比。在 NN 试验中,也在接种疫苗前进行 DTH。

体内免疫应答。为了测量疫苗的体内效力,在疫苗系列完成后 1 个月用 $100\mu\text{g}$ 皮内注射的 E75 连同盐水体积对照测量疫苗后的 DTH。所有接种疫苗的患者中,74%具有阳性疫苗后 DTH,对 E75 的平均硬结为 $14.0 \pm 1.4\text{mm}$,相比之下对照为 $2.1 \pm 0.5\text{mm}$ ($P < 0.0001$) (图 4A)。

NN 患者具有疫苗前 DTH 以及疫苗后 DTH (图 4B)。接种疫苗前, E75 和对照间 DTH 没有差异。接种疫苗后,对于 E75 的 DTH 应答比对照统计学上更大,并且疫苗后的 E75 DTH 相比于疫苗前明显不同 ($10.9 \pm 1.5\text{mm}$ 对 $2.8 \pm 0.8\text{mm}$, $P < 0.0001$)。

NP 患者比 NN 患者具有更大的接种疫苗后 E75 DTH 应答 (图 4C); 差别可能由于 NN 患者总体接到量低得多的 E75。作为剂量的函数来评估 DTH 应答,那些接受了 $6000\mu\text{g}$ E75 的患者相比于那些接受了 $< 6000\mu\text{g}$ 肽的患者具有显著更大的 DTH 反应 ($25.1 \pm 4.0\text{mm}$ 对 $13.3 \pm 1.9\text{mm}$, $P = 0.008$) (图 4D)。

HLA-A3⁺患者与 HLA-A2⁺患者具有可比较的接种疫苗后 DTH ($10.5 \pm 2.7\text{mm}$ 对 $15.1 \pm 1.9\text{mm}$, $P = 0.38$)。

实施例 5

HLA-A3⁺ ELISPOT 检测

也通过 E75-特异的干扰素- γ ELISPOT 来评估 HLA-A3⁺患者的疫苗应答。通过 ELISPOT, A3 患者证明了基线处的 0-30 点/ 10^6 个细胞的范围, 其增加到疫苗接种后的 3-448 点/ 10^6 个细胞, $p=0.04$ 。更重要地, 两组中临床复发相同 (A3, 9.1%对 A2, 8.2%) 并且相比之下, 对照组为 14.8%。

实施例 6

乳腺癌疫苗加强剂

患者。NP 和 NN 试验得到地方伦理审查委员会批准并且在 Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC 以及 Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA 进行。这些临床试验在由食品和药品监督管理局批准的试验性新药应用 (BB-IND #9187) 下进行。所有患者在开始加入时具有组织学上证实的乳腺癌, 完成了标准治疗, 为无疾病以及具有免疫能力的。用不同剂量的 E75 和 GM-CSF 并且以不同的方案在 6 个月周期接种 HLA-A2⁺和 HLA-A3⁺患者, 如上面实施例所述。如果患者离他们初次接种疫苗系列结束至少 6 个月, 那么向他们提供任选的加强剂剂量 E75 (1mg) +GM-CSF (0.250mg)。

25 位患者接受加强剂疫苗接种 (表 3)。仅有过半数 (56%) 具有 NP 乳腺癌。离前次疫苗接种的中位时间为 12 个月 (6-24 个月的范围)。如果患者自初次系列后 6 个月接受加强剂, 则按早期加强剂 (EB) 患者评估他们, 或者如果患者自初次系列后 >6 个月, 那么按晚期加强剂患者 (LB) 评估他们。

表 3 患者人口统计

	患者 (n=25)
年龄, 中位数 (年)	56 (范围31-76)
≥ T2	28%
结阳性	56%
3 级	32%
ER-PR-	28%
HER2/neu 过表达	20%
自初次标准治疗的时间 (月)	33 (9-200)
自初次疫苗系列的时间 (月)	12 (6-24)

如由 HLA-A2: IgG 二聚体所测量, 残留的 E75 特异的免疫性随时间下降。相比于 LB 组 (n=13) (0.44%, 0-2.67%, p=0.02), EB 组 (n=6) 中 CD8+ T-细胞的中位水平为 1.4% (0.61-3.43%范围)。对于 LB 患者, 他们在初始系列后 6 个月的中位二聚体水平为 0.70% (0.19%-1.55%)。这与 EB 患者 6 个月时的二聚体水平没有统计学上的不同 (图 5)。

加强剂疫苗。 E75 肽由 NeoMPS, Inc. (San Diego, CA) 以优良药品制造标准级别商业化生产。由高效液相色谱和质谱验证肽纯度, 且由氨基酸分析测定氨基酸含量。该肽纯化至大于 95%纯。制造商进行无菌和综合安全测试。在无菌盐水中以 0.5ml 中 1000 µg 的浓度将冻干肽复溶。将肽与 GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) 以 0.5ml 混合, 并将 1.0ml 接种物分为两份, 在间隔 5cm 的两位点皮内给予。以与初次系列相同的非常手段给予加强剂疫苗接种。

毒性。 接种疫苗后 1 小时观察患者速发性过敏性反应。通过用于 Adverse Events 3.0 版本的 NCI Common Terminology criteria 将毒性分级, 并以 0-5 的标度报告。之前具有显著的 (2 级或 3 级) 局部或全身毒性的患者接受 0.125mg 的降低剂量的 GM-CSF。

加强剂剂量得到非常好的耐受 (图 6), 主要为 1 级局部毒性 (期望的效果)。过半数患者没有全身不适。没有出现 3 级或 4 级毒性。只有 1 位患者 (4%) 在加强剂期间比在初次系列期间具有更高级的毒性 (2 级局部炎症)。

外周血单核细胞细胞 (PBMC) 分离和培养。 在加强剂接种前、以及在

加强剂接种后 3 至 4 周抽血, 在 Vacutainer CPT 试管中分离外周血单核细胞。并用做淋巴细胞来源。

HLA-A2: 免疫球蛋白二聚体检测。使用上面实施例 3 中所述的二聚体检测法直接评估自患者中新分离的 PBMC 中的 CD8⁺ E75 特异细胞的存在。简言之, 通过用过量(5 μg)的肽和 0.5 μg 的 β2 微球蛋白(Sigma, St. Louis, MO) 在 37°C 过夜孵育 1 μg 二聚体, 而令 HLA-A2: 免疫球蛋白(Ig) 二聚体(PharMingen, San Diego, CA) 荷载 E75 或对照肽(叶酸结合蛋白肽 E37 (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID NO: 5)), 然后在 4°C 储存至使用。洗涤 PBMC 并在 PharMingen 染色缓冲液(PharMingen) 中重悬, 并在 5 ml 圆底聚苯乙烯试管(Becton Dickinson, Mountain View, CA) 中以 5×10^5 个细胞/100 μl/管添加, 并用荷载的二聚体和抗体染色。每位 HLA-A2⁺ 患者中, 在疫苗加强剂之前和之后测定 CD8⁺ E75 特异细胞水平。

在加强剂接种前以及之后 3-4 周量化抗原特异的 CD8⁺T 细胞。在两组中, 显著的残留免疫性(SRI, 定义为抗原特异性 CD8⁺ T-细胞 ≥ 0.5%) 明显不同, 相比于 LB 患者的 30.8%(4/13), EB 患者为 100%(6/6)($p=0.01$)。那些缺乏 SRI($n=8$) 的患者中, 存在从 0.43%(0-0.49%) 增至 0.87%(0-2.3%; $p=0.08$) E75-特异性 CD8⁺ T-细胞的增加趋势(图 7)。

酶联免疫斑点检测。使用 BD ELISPOT 试剂盒立即(离体)或与肽孵育 7 天后检测生产 IFN-γ 的细胞。在含有 IL-7 的培养基(离体)或在具有或没有 IL-7 的培养基(7 天)中, 将新鲜的 PBMC 以每孔 5×10^5 个细胞(离体)或 1×10^5 (7 天) 的浓度于 ELISPOT 平板上铺板。肽(E37、FluM、E75、GP2、HER2/neu 1 μg 或 5 μg) 存在或肽不存在下, 刺激细胞 16 小时(离体)或 7 天。7 天孔中的其他孵育包括 E75+HER2/neu 1 μg 或 5 μg 的组合。如果有足够的细胞可用, 那么对每种血样进行总计 16 个检测。孵育结束后, 按照制造商的说明对平板显色。加入生物素化的检测抗体, 并且在 4°C 过夜孵育该板。孵育后, 洗涤板, 加入 Avidin-HRP 溶液持续 1 小时, 并使用 AEC 底物溶液显色点。使用 Immunospot Series 2 分析仪和 ImmunoSpot 软件对点计数。

基于从单次抽血可利用的 PBMC, 在高达 16 个不同检测中, 在加强剂接种前后量化所有患者的产生 IFN- γ 的细胞。22 位患者具有至少一对加强剂前和后 ELISPOT 检测 (每位患者平均 10 个检测, 1-14 的范围)。这些患者中, 加强剂前总计 255 个检测, 其中 54.5% 显示了可检测到的 IFN- γ 产生。194 对检测中 (同一患者的加强剂前和后的样品以相同肽浓度进行) 78 位 (40.2%) 显示出使用加强剂, 产生 IFN- γ 的细胞增加。总计 20/22 (91%) 的患者在至少一次检测中显示出产生 IFN- γ 的细胞增加, 在至少 50% 的检测中, 11 位 (50%) 显示出产生 IFN- γ 的细胞增加。结果如图 8 所示。

局部反应。按照应答的体内功能评估来测量局部反应 (LR)。疫苗接种后 48-72 小时测量 LR, 在两个方向测量, 并且使用敏感性圆珠笔法以正交平均值 $\pm$ SE 报告。将 LR 与患者自己之前的 LR 相比以评估对于加强剂的应答。

自他们初次系列后接受加强剂 ≤ 9 个月 ($n=12$) 的患者比自初次系列 > 9 个月 ($n=13$) 的患者 (79 ± 4 mm, $p = 0.01$) 具有显著更大的 LR (103 ± 7 mm)。当在初次系列结束时比较两组时, 他们没有差异 (≤ 9 个月 81 ± 5 mm; > 9 个月 85 ± 8 mm, $p=0.73$)。结果如图 9 和 10 所示。

统计分析。以平均值报道 HLA: IgG 二聚体, 使用 Wilcoxon 检验来计算 P 值。对于比例比较, 使用 Fisher's 准确检验。适当时, 以配对或未配对 Student's t-检验进行局部反应比较。

实施例 7

按照 HER2/*neu* 表达水平的 HER2/*neu* (E75) 肽疫苗应答

在结阳性和结阴性 BCa 患者中用 HER2/*neu* E75 肽疫苗进行临床试验。这些患者由 HER2/*neu* 表达的所有水平组成。主要通过两种检测: 免疫组织化学 (IHC) 和荧光原位杂交 (FISH) 进行测定 HER2/*neu* 状态。IHC 检测 HER2/*neu* 蛋白的过表达并且以 0 至 3+ (0=阴性, 1+=低表达, 2+=中度, 和 3+=过表达) 的半定量标度报告。另一方面 FISH 检测 HER2/*neu* 基因的扩增

(过量拷贝)并且以 HER2/*neu* 与 17 号染色体的比来表示,如果 FISH > 2.0 个拷贝,那么解释为“过表达”。IHC 和 FISH 的一致率约 90%。

材料和方法:

根据 HER2/*neu* 表达水平,对加入我们的二期 E75 疫苗试验的 163 位 BCa 患者进行小组分析。评估患者为低表达者 (LE=IHC 1+-2+和 FISH >0 但<2.0) 对过表达者 (OE=IHC 3+和/或 FISH >2.0), 并且通过 IHC 状态评估 (0, 1+, 2+, 3+)。对于标准临床病理因素、对疫苗的免疫应答 (体内 DTH 反应和体外 HLA-A2: IgG 二聚体检测) 以及临床反应 (绝对复发和死亡率) 进行分析。

患者特征和临床方案: E75 NP 和 NN 试验得到伦理审查委员会批准并且作为试验性新药应用 (BB-IND#9187) 在 Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC 以及 Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA 进行。所有患者都在组织学上证实患有乳腺癌 (BCa), 并在加入前完成了手术、化疗和放疗 (按照需要) 的标准程序。激素治疗的患者继续他们的方案。经过适当的咨询并同意后,BCa 患者加入适当的试验 (NP 或 NN), 并且经 HLA 分型, 因为 E75 主要结合在大约 40-50% 的一般群体中发现的 HLA-A2。疫苗接种 HLA-A2+ 患者, 并且前瞻性地观察 HLA-A2- 患者的临床复发。随后疫苗接种 HLA-A3+ 患者。在接种之前, 用一组回忆抗原 (Mantoux 检测) 对患者进行皮肤测试。如果患者对 > 2 种抗原有反应 (>5 mm), 则认为他们是有免疫能力的。

疫苗: E75 肽由 NeoMPS, Inc. (San Diego, CA) 以优良药品制造标准级别商业化生产。由高效液相色谱和质谱验证肽纯度 (>95%)。制造商进行无菌和综合安全测试。在无菌盐水中以 0.5ml 中 100mcg、500mcg、或 1000mcg 的冻干肽复溶。肽与 GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) 以 0.5ml 混合。将 1.0ml 接种物分为两份, 在间隔 5cm 的两位点以相同手段皮内给予。

接种疫苗系列: 将 NP 试验设计为两步安全试验, 初始阶段肽剂量升高, 随后阶段方案改变。以前公开了疫苗系列的细节。简言之, 将 3-6 位患者

各指定接受 4 或 6 次每月 100 mcg、500 mcg、或 1000 mcg 的 E75 注射（分别为 100: 6、500: 4、500: 6、1000: 4 和 1000: 6）。为了确定和确认后一剂量组中占较大患者数量的 NP 患者中最佳剂量，最终扩大了组。

将 NN 试验设计为通过改变 GM-CSF 的剂量以及改变接种方案而进一步描述最佳生物学剂量。这一试验允许 12 位具有 HER2/*neu* IHC 0 肿瘤的患者加入以确定接种假定为首次接受抗原的宿主的可行性。具有恒定的 500mcg 的 E75 肽的每个剂量组分配 10 位患者以不同 GM-CSF 剂量接受 3、4 或 6 次每月注射（125mcg 或 250mcg）。

毒性: 接种疫苗后 1 小时观察患者速发性过敏反应，并且患者在 48-72 小时后返回以测量他们的注射位点，并接受毒性询问。通过用于 Adverse Events 3.0 版本的 NCI Common Terminology criteria 将毒性分级（以 0-5 的标度报告）。只有在较低剂量组中没有明显毒性产生时，才从一个剂量组升级至下一个剂量组。根据在连续接种期间发生的最大局部和全身毒性来报告患者特异的结果。

外周血单核细胞细胞 (PBMC) 分离和培养: 在每次接种疫苗前、接种系列完成 1 个月后（接种疫苗后）和六个月后（长期）抽血。抽出 50ml 血液并分离 PBMC。洗涤 PBMC 且在培养基中重悬，如前述用做淋巴细胞来源。

HLA-A2: 免疫球蛋白二聚体检测: 如前所述使用二聚体检测法直接评估患者中新分离的 PBMC 的 CD8⁺ E75 特异细胞的存在。简言之，通过用过量（5mcg）的肽和 0.5 mcg 的 $\beta 2$ 微球蛋白（Sigma, St. Louis, MO）在 37 °C 过夜孵育 1mcg 二聚体，而令 HLA-A2: 免疫球蛋白(Ig)二聚体(PharMingen, San Diego, CA)荷载 E75 或对照肽(E37, 叶酸结合蛋白(25-33) RIAWARTEL (SEQ ID NO: 5))，然后在 4°C 储存至使用。洗涤 PBMC 并在 PharMingen 染色缓冲液（PharMingen）中重悬并在 5 ml 圆底聚苯乙烯试管（Becton Dickinson, Mountain View, CA）中以 5×10^5 个细胞/100 μ l/管添加，并用荷载的二聚体和抗体染色。测定每位患者中应答各相继疫苗接种的 CD8⁺ E75 特异细胞的水平，并且将平均接种疫苗后水平与他们接种疫苗前的水

平进行比较。

迟发型过敏反应 (DTH): 两种试验中, 在按前述完成疫苗系列后 1 个月, 用 0.5ml 普通盐水中 100mcg 的 E75 肽 (没有 GM-CSF) 来评估 DTH 反应, 并用 0.5ml 普通盐水作为体积对照。使用敏感圆珠笔法在 48-72 小时二维测定 DTH 反应并以正交平均值报告以及与对照对比。在 NN 试验中, 也在接种疫苗前进行 DTH。

临床复发: 按照由患者的主要肿瘤科医师所述的护理癌症标准筛查, 对所有患者观察临床复发。若经活组织切片检查证实, 或由主要的肿瘤科团队对复发进行治疗, 则认为该患者复发。

统计分析: 使用 Kaplan-Meier 方法的生存分析比较组间的复发率, 以及使用 log-ranked 分析比较复发患者的比例。酌情使用 Wilcoxon、Fisher's 精确检验或者 χ^2 计算临床病理因素的 P 值。使用配对或未配对双尾 Student's 检验计算用于比较接种疫苗前和接种疫苗后的二聚体水平的 P 值。

结果:

评估了 LE (对照=44, 疫苗=56) 对 OE 患者 (对照=22, 疫苗=29) 和 IHC 状态对照和疫苗组 (分别为 0 = 5 对 7, 1+ 15 对 25, 2+ 24 对 26, 3+ 13 对 19)。LE 对 OE 以及全部 IHC 状态的接种疫苗组都进行了免疫应答; 然而, LE 患者, 并且更具体是 IHC 1+ 患者具有增加的长期体外免疫应答 (分别是 $p=0.04$ 和 $p=0.08$)。此外 LE 患者相比于它们的对照组具有趋于减少的死亡率, IHC 1+ 患者相对于对照组具有减少的死亡率 (分别是 $p=0.08$ 和 $p=0.04$)。

患者: 186 位患者加入 E75 疫苗研究; 9 位退出 (4 位对照患者和 5 位接种疫苗患者——无一一人是因为毒性原因), 造成 177 位完成该试验。NP 试验中的所有对照 (C) 和接种疫苗的 (V) 患者 (C=46, V=45, 总计=91 位患者) 进行了 IHC、FISH 或该两种检测。NN 试验 (C=35, V=51, 总计=86 位患者) 中, 12 位患者具有 HER2/*neu* IHC 0 肿瘤 (C=5, V=7)。并且在 NN 试验中, 14 位患者的 (C=7, V=7) 肿瘤没有经历 IHC 或 FISH——已将

这 14 位患者排除出小组分析；因此 163 位患者可用于分析。

LE 对 OE 小组分析:

每种表达的患者: 进行小组分析来比较 LE (IHC 1+-2+或 FISH >0 且 <2.0) 对 OE (IHC 3+或 FISH >2.0)。对照组中 66 位患者进行了 IHC 或 FISH (LE=44, OE=22)。E75 疫苗组中总计 85 位患者进行了 IHC 或 FISH (LE=56, OE=29)。C 和 V 患者的可比较数为 LE 组中 (分别是 67%对 66%) 和 OE 组中 (分别是 33%对 34%)。

表 4 示出了 LE 对 OE 患者的人口统计、预后因素以及治疗谱。对于 LE 患者, 在 C 和 V 患者间没有看到统计学上的差异。对于 OE 患者, 相比 C 组, 统计学上更大数量的 V 患者为激素受体阴性 ($p=0.02$) (表 4)。

表 4、加入 E75 二期试验的患者 LE 对 OE 的人口统计、预后因素以及治疗谱。

	LE 对照 (n = 44)	LE 疫苗 (n = 56)	P	OE 对照 (n = 22)	OE 疫苗 (n = 29)	P
中值年龄, 年	55	56		50	52	
范围, 年	31-82	27-77	0.7	32-75	37-68	0.1
种族						
白, %	86.4%	89.3%	0.8	72.7%	86.2%	0.3
其它, %	13.6%	10.7%	0.8	27.3%	13.8%	0.3
肿瘤大小						
T2-T4, %	38.6%	33.9%	0.7	31.8%	34.5%	0.9
组织学分级						
III 级, %	27.2%	30.4%	0.8	63.6%	62.1%	0.9
结阳性 (NP), %	54.5%	58.9%	0.7	90.1%	55.2%	0.06
激素受体 -, %	15.9%	19.6%	0.8	27.3%	62.1%	0.02*
化疗, %	72.7%	75.0%	0.8	86.4%	96.6%	0.3
XRT, %	84.1%	75.0%	0.3	72.7%	75.9%	NS
激素治疗, %	81.8%	76.8%	0.6	63.6%	41.4%	0.2
赫塞汀, %	0.2%	0.2%	NS	9.1%	24.1%	0.3

*统计学上显著差异

每种表达的免疫应答: E75 疫苗能够引发 LE 和 OE 患者的体外免疫应答。在两组中看到从疫苗前到最大 E75-特异 CD8+ T 细胞的显著增加 (LE $p<0.001$, OE $p<0.001$)。相比于 OE 患者, LE 患者具有统计学上更高的最

大免疫应答 ($p=0.04$) (图 11A)。

如通过 DTH 疫苗前和疫苗后所测量的, LE 和 OE 患者都能够引发体内免疫应答。在两类中都看到显著的前-后 DTH 增加 (LE $p<0.001$, OE $p=0.02$) (图 11B)。尽管 LE 的后-DTH 大于 OE 的后-DTH (分别为 15.9 ± 1.9 mm 对 12.8 ± 2.0 mm), 但没有统计学上的差异 ($p=0.5$)。总体上, E75 疫苗在 LE 患者中表现为免疫学上更加活跃。

每种表达的临床应答: 图 11C 和 11D 指出了以复发和死亡率评估的临床应答。与 C 患者相比 (LE & OE=18.2%), 所有 V 患者 (LE=10.7%对 OE=13.8%) 似乎具有降低的复发率, 但是这些数字并非统计学上显著的。更重要的, V 患者存在趋于降低的死亡率的倾向, 更令人印象深刻地见于 LE 患者 (C=6.8%对 V=0.0%; $p=0.08$)。

IHC 状态小组分析:

每种 IHC 状态的患者: C 组具有 57 位经历了 IHC (0=5, 1+=15, 2+=24, 3+=13) 的患者的病理样本。E75V 组具有 77 位经历了 IHC (0=7, 1+=25, 2+=26, 3+=19) 的患者的病理样本。在每个 IHC 组中 C 和 V 患者的百分数可比较 (0 C=8.8%对 V=9.1%; 1+ C=26.3%对 V=32.5%, 2+ C=42.1%对 V=33.8%, 3+ C=22.8%对 V=24.7%)。

表 5 显示了每种 IHC 状态的人口统计、预后因素以及治疗谱。对于 IHC 状态组, 预后因素存在两种显著差异。C 组中 IHC 1+患者具有比 V 组更大的 T2-T4 肿瘤百分数 (66.7%对 30.8%, $p=0.05$)。IHC 3+C 患者全部为 NP, 42.1%的 V 患者为 NP ($p=0.003$)。

表 5 加入 E75 二期试验的患者按 HER2/neu 表达水平的人口统计、预后因素以及治疗谱

	0 对照 (n=5)	0 疫苗 (n=7)	p	1 ⁺ 对照 (n=15)	1 ⁺ 疫苗 (n=25)	p	2 ⁺ 对照 (n=24)	2 ⁺ 疫苗 (n=26)	p	3 ⁺ 对照 (n=13)	3 ⁺ 疫苗 (n=19)	p
中值年龄, 年	50	60		54	54		50	57		49	51	
范围, 年	38-74	31-74	0.4	44-82	42-71	0.4	31-75	27-77	0.2	31-74	37-62	0.2
种族												
白, %	100.0%	71.4%	0.5	73.3%	84.0%	0.4	87.5%	92.3%	0.7	61.5%	89.5%	0.1
其它, %	0.0%	28.6%	NS	26.7%	16.0%	NS	12.5%	7.7%	NS	40.5%	10.5%	NS
肿瘤大小												
T2-T4, %	40.0%	14.3%	0.5	66.7%	28.0%	0.05*	29.2%	46.2%	0.2	38.5%	36.8%	0.8
组织学分级												
III 级, %	20.0%	14.3%	0.6	33.3%	36.0%	0.7	37.5%	38.5%	0.9	61.5%	57.9%	0.8
结阳性(NP), %	0.0%	0.0%	NS	80.0%	60.0%	0.3	79.2%	80.8%	0.8	100.0%	42.1%	0.003*
激素受体-, %	20.0%	14.3%	0.6	13.3%	28.0%	0.4	16.7%	11.5%	0.9	38.5%	63.2%	0.2
化疗, %	80.0%	42.9%	0.3	80.0%	76.0%	0.9	87.5%	96.2%	0.5	92.3%	94.7%	0.6
XRT, %	100.0%	42.9%	0.08	66.7%	76.0%	0.7	87.5%	96.2%	0.5	69.2%	94.7%	0.1
激素治疗, %	80.0%	85.7%	0.6	80.0%	72.0%	0.9	79.2%	73.1%	0.6	53.8%	73.7%	0.3
赫塞汀, %	0.0%	0.0%	NS	0.0%	0.0%	NS	8.3%	7.7%	0.9	7.7%	10.5%	0.7

*统计学上显著差异

每种 IHC 状态的免疫应答: E75 疫苗能够引发所有 IHC 类型的体外免疫应答。所有应答疫苗的 IHC 组 (0, 1+, 2+, 3+) 都看到从疫苗前到最大 E75-特异 CD8+ T 细胞的显著增加 (0 $p=0.007$, 1+ $p<0.001$, 2+ $p=0.004$, 3+ $p=0.002$)。只有 IHC 1+患者趋于 E75-特异 CD8+ T 细胞显著的疫苗前到长期增加的倾向 (图 12A)。

此外, 如通过 DTH 疫苗前和疫苗后所测量的, 所有患者能够引发体内免疫应答。在所有 IHC 类型中都看到显著的前-后 DTH 增加 (0 $p=0.03$, 1+ $p=0.02$, 2+ $p=0.02$, 3+ $p=0.05$)。总体上, 不论由 IHC 测量的 HER2/*neu* 表达如何, 疫苗是免疫学上有效的, 但在 IHC 1+患者中表现为最有效 (图 12B)。

每种 IHC 状态的临床应答: 图 12C 和 12D 指出了以复发和死亡率评估的临床应答。比较 C 和 V 患者时, 所有 IHC 类型 (除了 IHC 0, 其没有患者复发) 都具有降低的复发率, 尽管该数字并未达到统计学上的显著性。更重要的, IHC 1+患者存在显著的死亡率降低, C=20%和 V=0%死亡率 ($p=0.04$)。

之前的二期试验中, 在 20 个月时, E75 疫苗的给药造成减小的复发率以及趋于减小的死亡率的倾向, 但这些差异缺乏显著性, 因为没有使用加强剂而免疫性减弱。显示出了所有 HER2/*neu* 表达水平的患者均对该疫苗产生免疫应答, 但是 LE (且尤其是 IHC 1+) 患者具有更加强烈的免疫应答, 并且由减小的死亡率取得了最大临床益处。也显示了首次接受抗原的患者也免疫应答该疫苗。

当在此对于物理性质 (例如分子量) 或化学性质 (例如化学式) 使用范围时, 旨在包括其中的范围特定方面的所有组合以及子组合。

出于所有目的, 这一说明书中引用的所有出版物和专利申请在此通过整体引用作为参考, 就如同出于所有目的而具体且单独指明要通过引用而参考每一单独出版物或专利申请。

尽管出于理解的清楚性而通过说明和实例的方式具体描述了前述发明, 对于本领域普通技术人员显而易见的是, 鉴于这一发明的教导, 可以

对其进行某些改变和修改而不悖离所附权利要求的精神和范围。

序列表

SEQ ID NO:1 (HER2/neu 氨基酸序列)

MKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL
QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGQTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA
SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSR
ACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK
HSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLST
DVGSCTLVCPHNLQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEF
AGCKKIFGSLAFLPESFDGPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDL
SVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTV
PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQ
ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFC
VARCPSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSI
ISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQM
RILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDE
AYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWC MQ
IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVP I
KWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQP
PICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDS
TFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLT
LGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSP LQRYSEDPTV
PLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKT LSPG
KNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAP P
STFKGTPTAENPEYLGLDVPV

SEQ ID NO:2 (E75 肽)

KIFGSLAFL

SEQ ID NO:3
BIMAS

SEQ ID NO:4
SYFPEITHI

SEQ ID NO:5
RIAWARTEL

<110> 亨利·M·杰克逊军事医学促进基金会

<120> 预防乳腺癌复发的疫苗

<130> HMJF-0009

<140> PCTUS0860044

<141> 2008-04-11

<150> US 60/941,524

<151> 2007-06-01

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu
1 5 10 15

Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu
20 25 30

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln
35 40 45

Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val
50 55 60

Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp
65 70 75 80

Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr			
85	90	95	
Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu			
100	105	110	
Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn			
115	120	125	
Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His			
130	135	140	
Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg			
145	150	155	160
Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly			
165	170	175	
Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly			
180	185	190	
Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu			
195	200	205	
Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala			
210	215	220	
Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala			
225	230	235	240
Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu			
245	250	255	
Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn			
260	265	270	
Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His			
275	280	285	
Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys			
290	295	300	
Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu			
305	310	315	320

Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly
325 330 335

Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
340 345 350

Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln
355 360 365

Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala
370 375 380

Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val
385 390 395 400

Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
405 410 415

Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly
420 425 430

Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His
435 440 445

Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu
450 455 460

His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala
465 470 475 480

Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr
485 490 495

Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu
500 505 510

Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg
515 520 525

His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val
530 535 540

Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr

545	550	555	560
Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro			
	565	570	575
Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala			
	580	585	590
Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp			
	595	600	605
Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile			
610	615	620	
Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val			
625	630	635	640
Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr			
	645	650	655
Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro			
	660	665	670
Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr			
	675	680	685
Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val			
690	695	700	
Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val			
705	710	715	720
Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu			
	725	730	735
Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val			
	740	745	750
Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr			
	755	760	765
Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg			
770	775	780	

Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala
 785 790 795 800

Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu
 805 810 815

Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr
 820 825 830

Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His
 835 840 845

Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile
 850 855 860

Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val
 865 870 875 880

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile
 885 890 895

Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro
 900 905 910

Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys
 915 920 925

Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser
 930 935 940

Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln
 945 950 955 960

Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg
 965 970 975

Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu
 980 985 990

Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 995 1000 1005

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1010 1015 1020

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1025 1030 1035

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1040 1045 1050

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1055 1060 1065

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
1070 1075 1080

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
1085 1090 1095

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1100 1105 1110

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
1115 1120 1125

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
1130 1135 1140

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
1145 1150 1155

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
1160 1165 1170

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
1175 1180 1185

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
1190 1195 1200

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
1205 1210 1215

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1220 1225

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 2

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 3

Asx Ile Met Ala Ser
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 4

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile
1 5

<210> 5
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 5

Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu
1 5

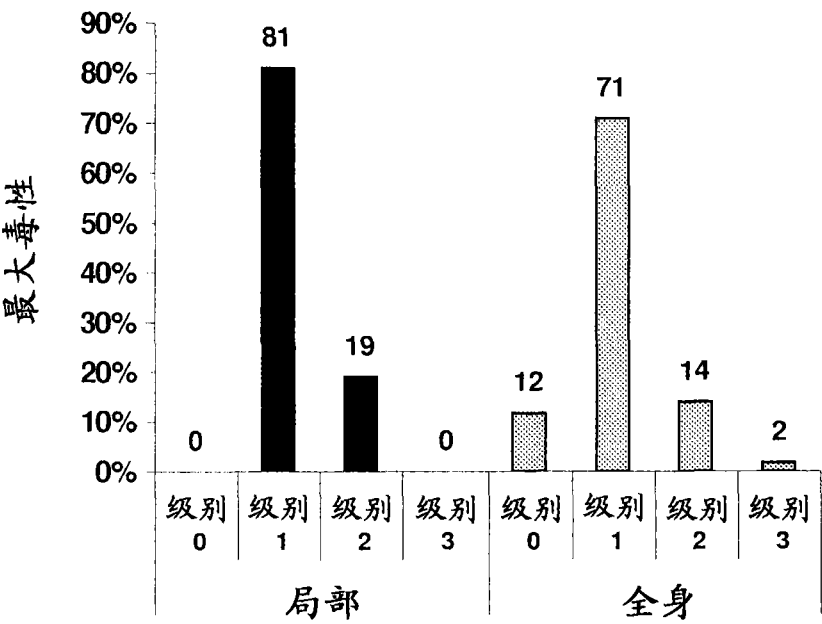


图 1

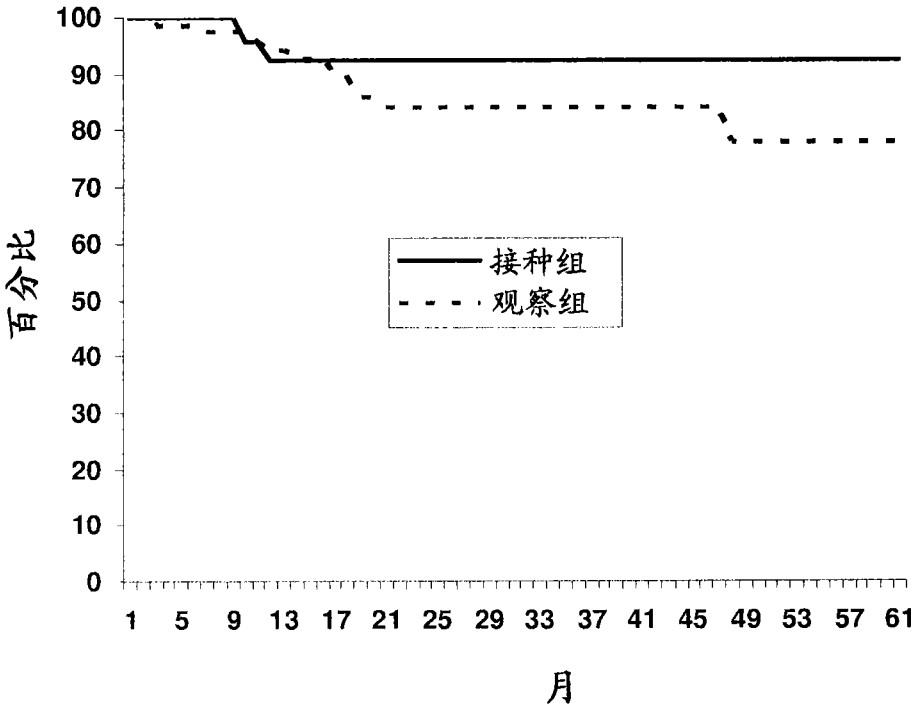


图 2

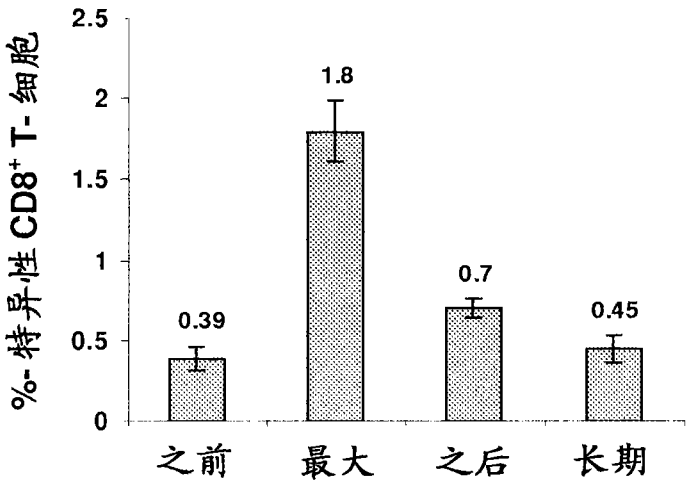


图 3A

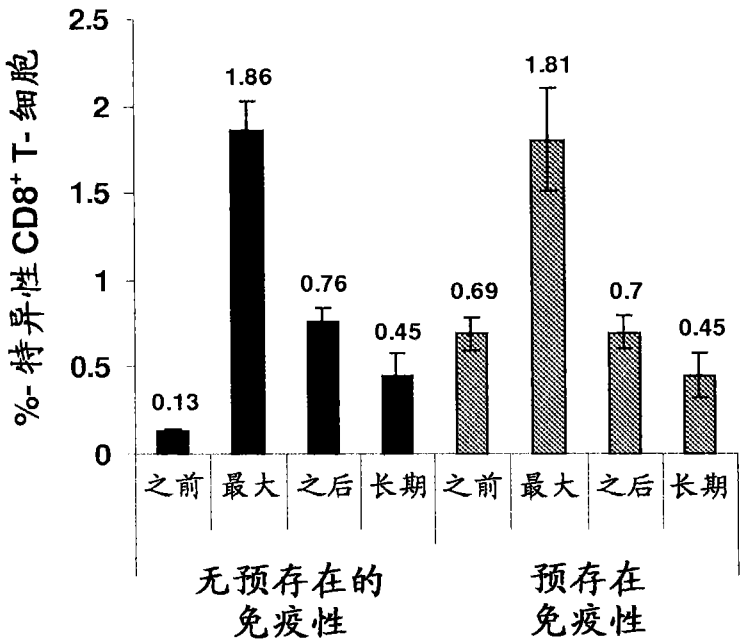


图 3B

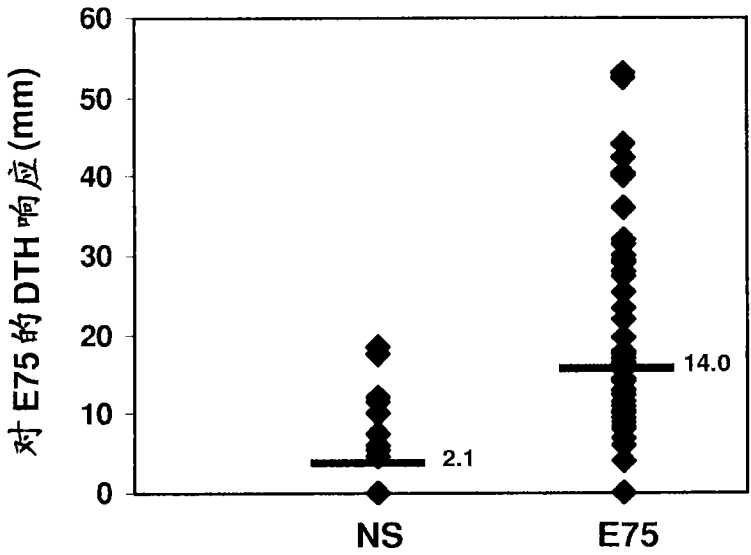


图 4A

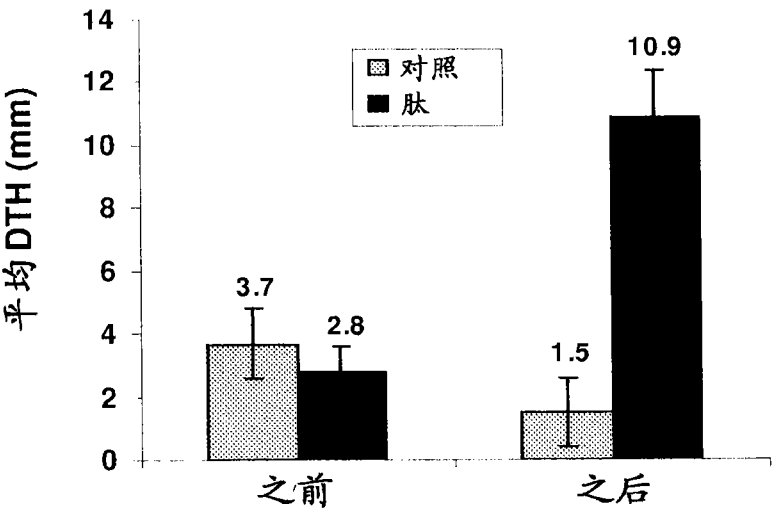


图 4B

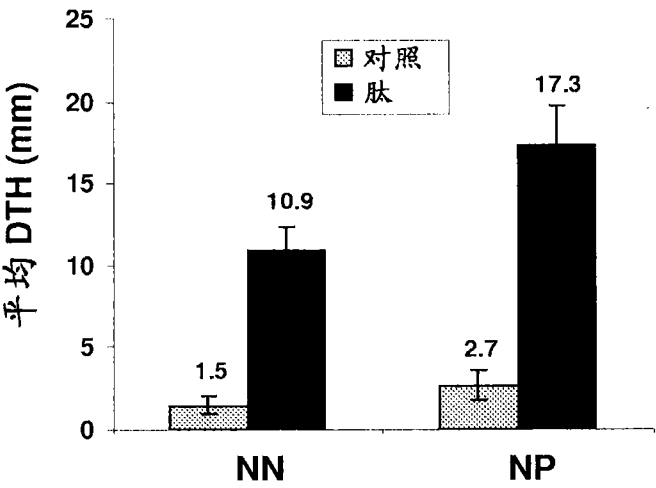


图 4C

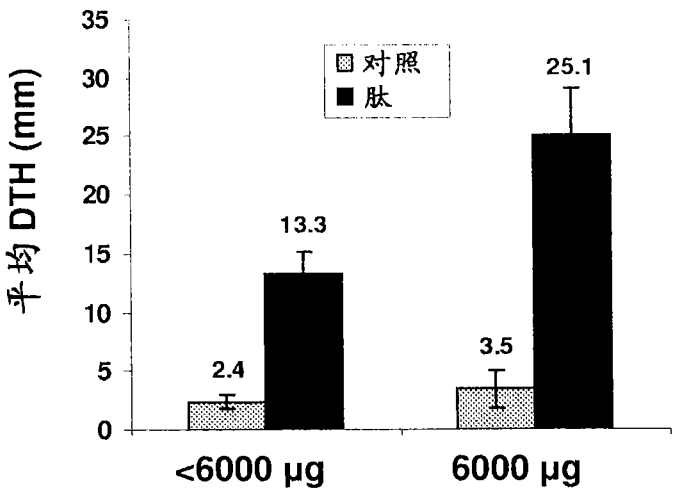


图 4D

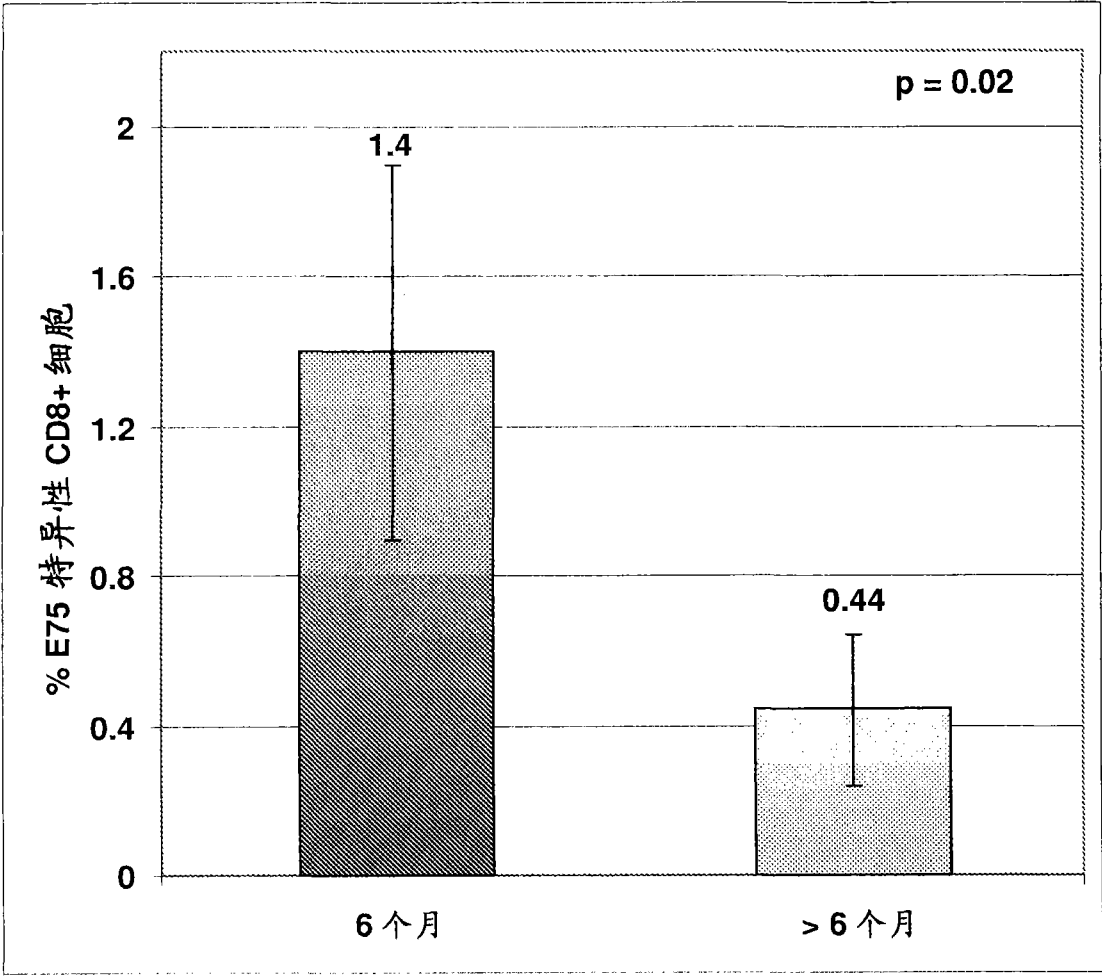


图 5

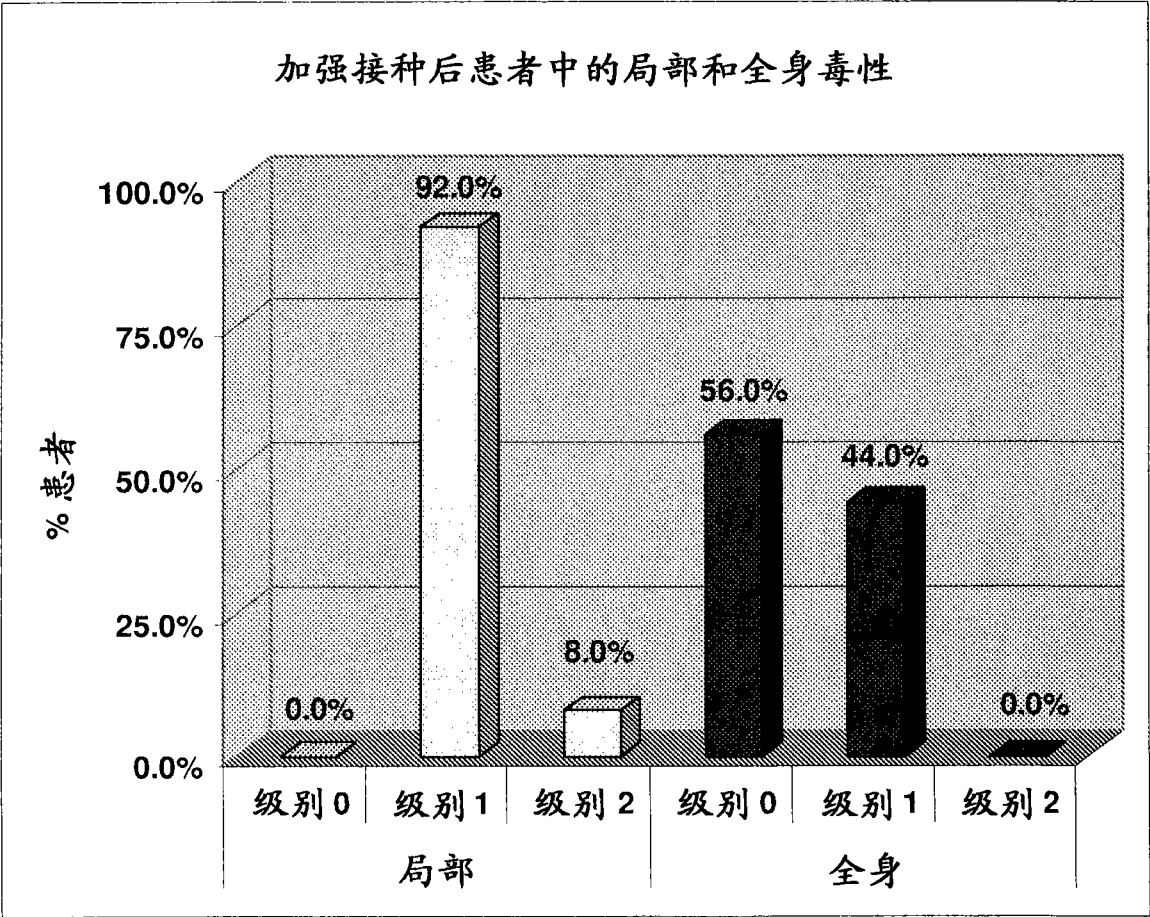


图 6

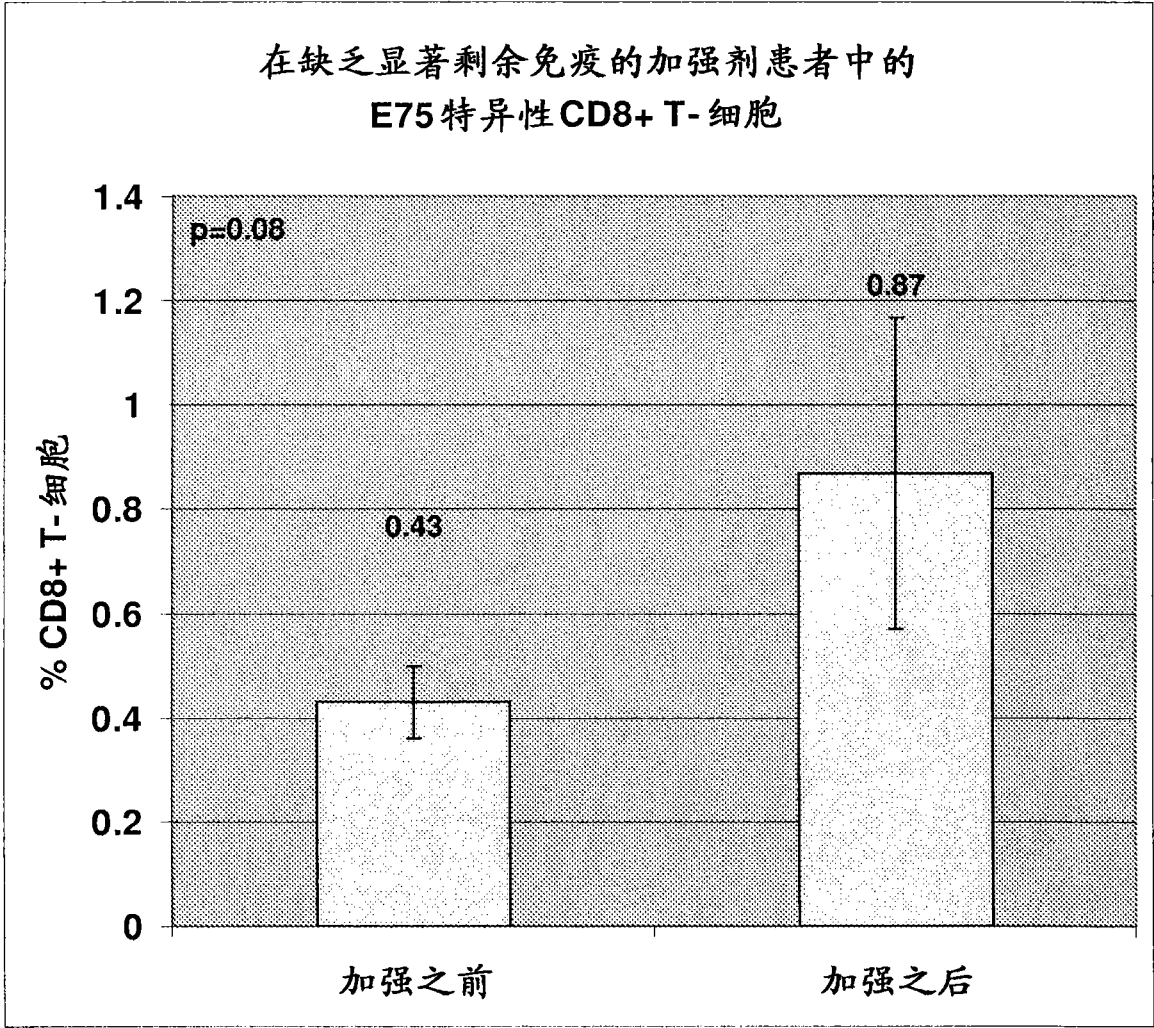


图 7

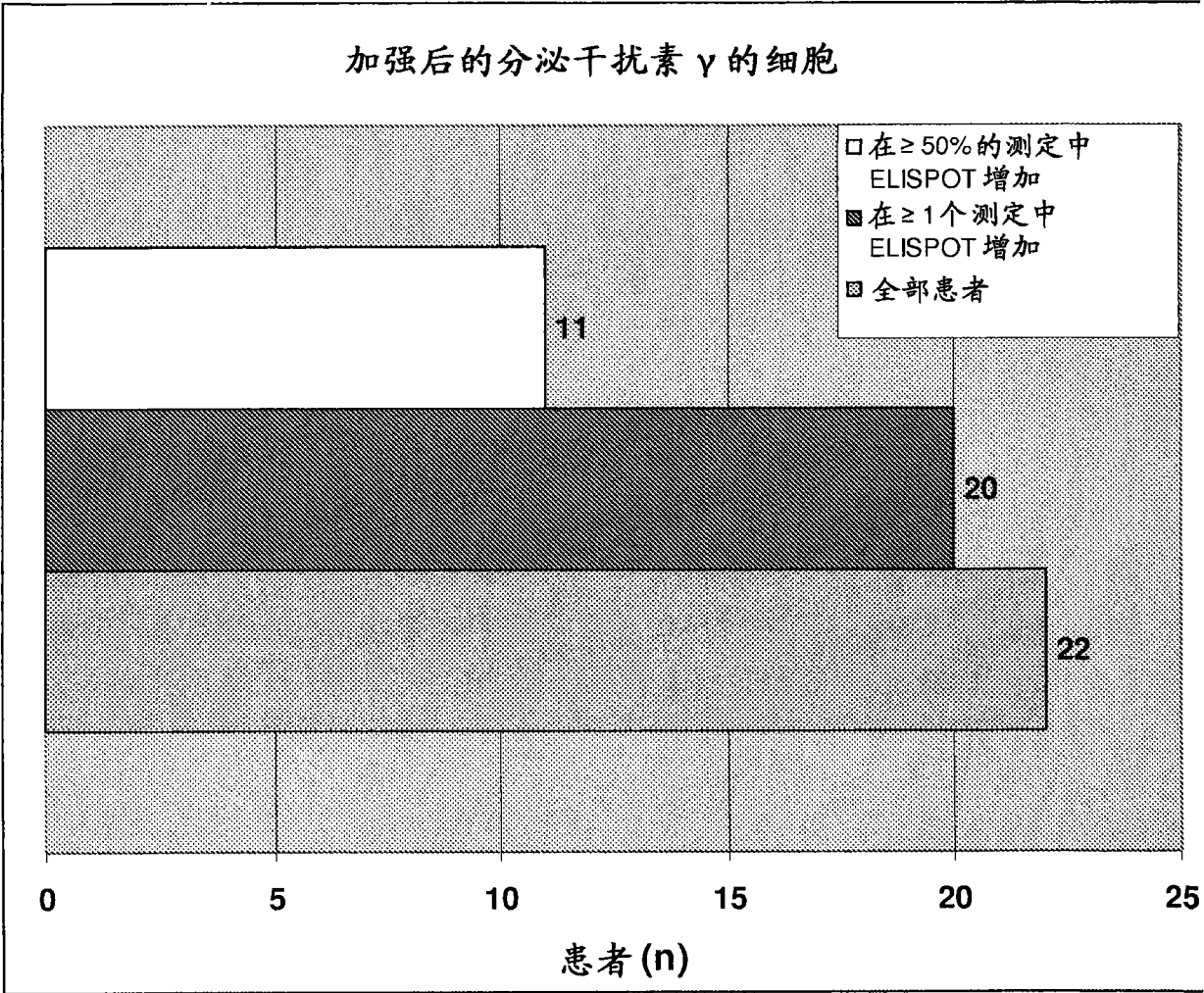


图 8

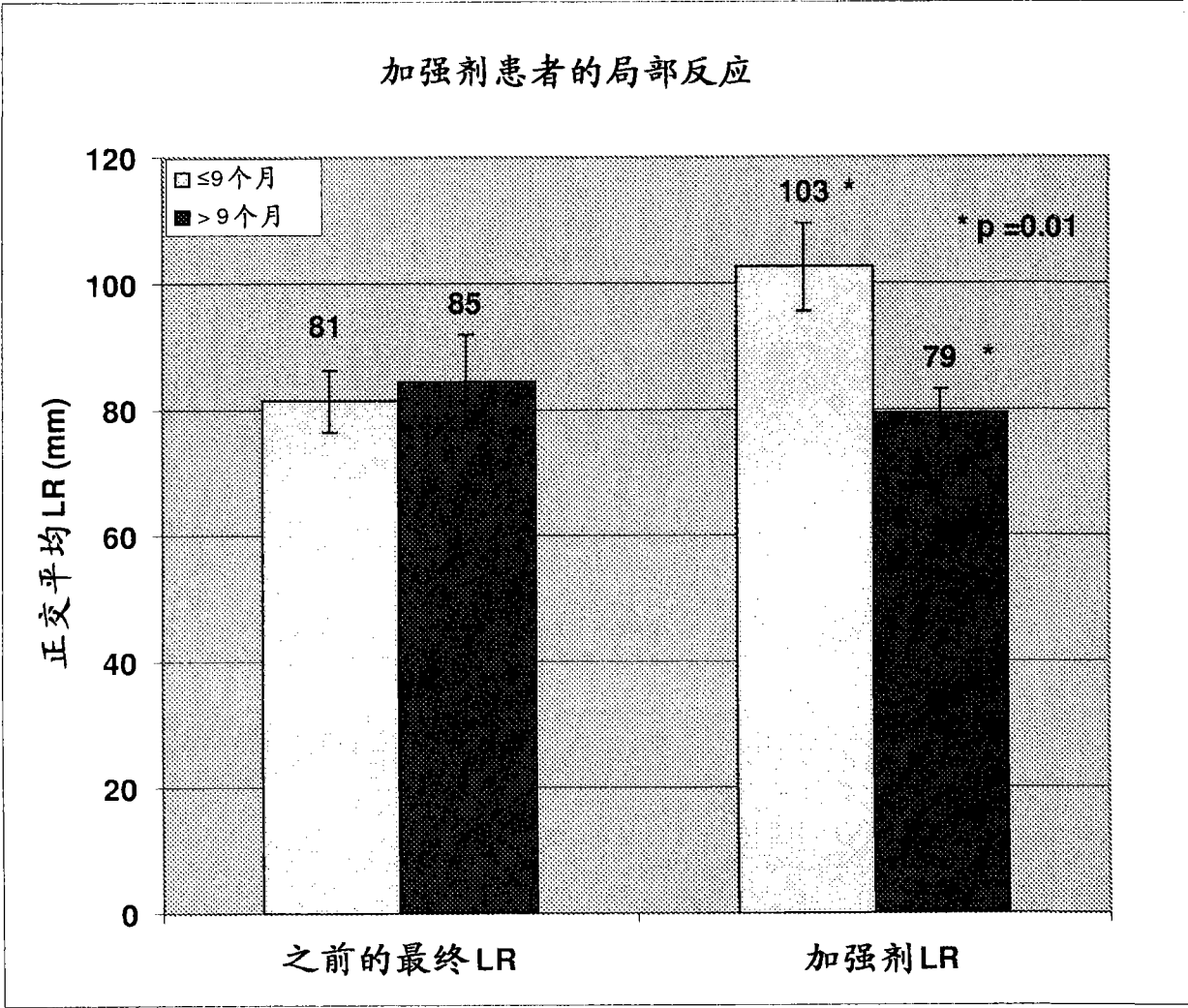


图 9

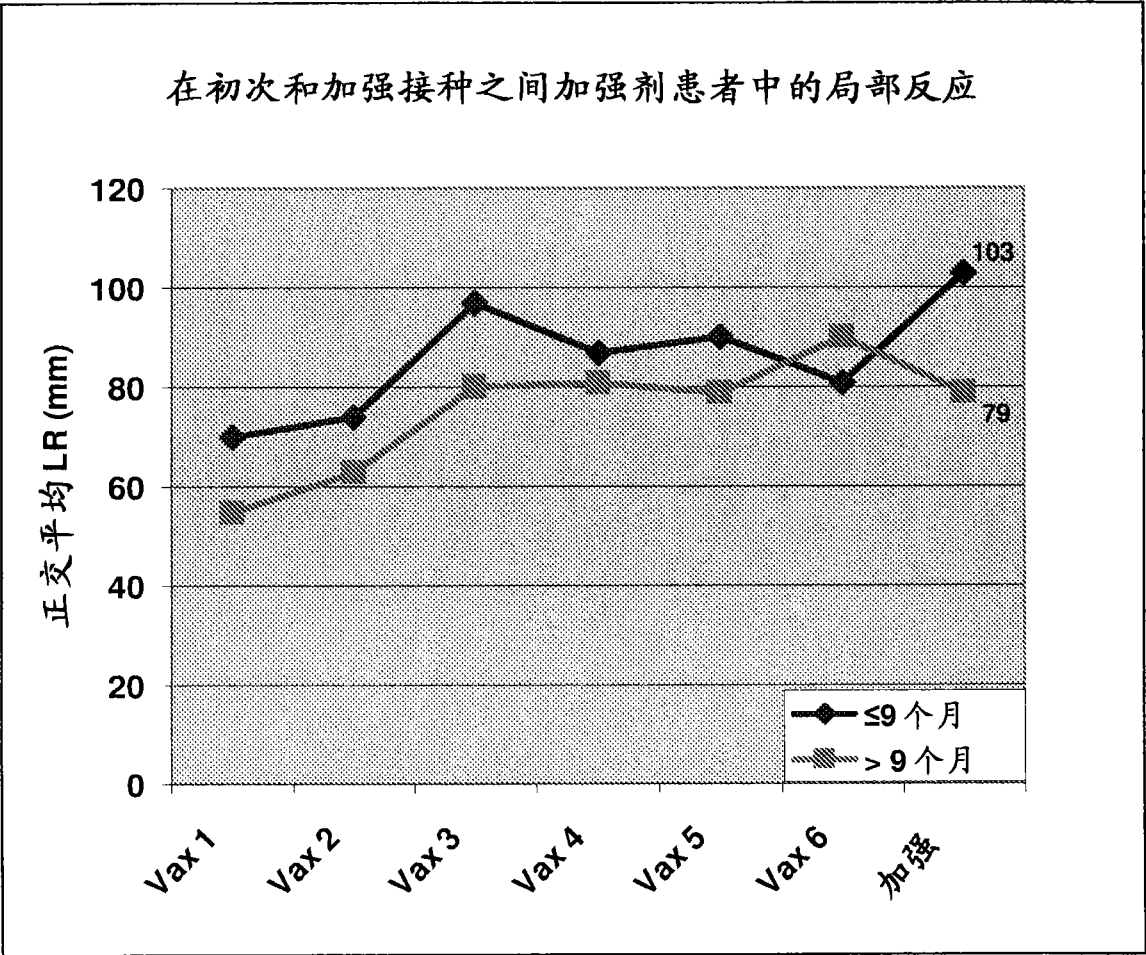


图 10

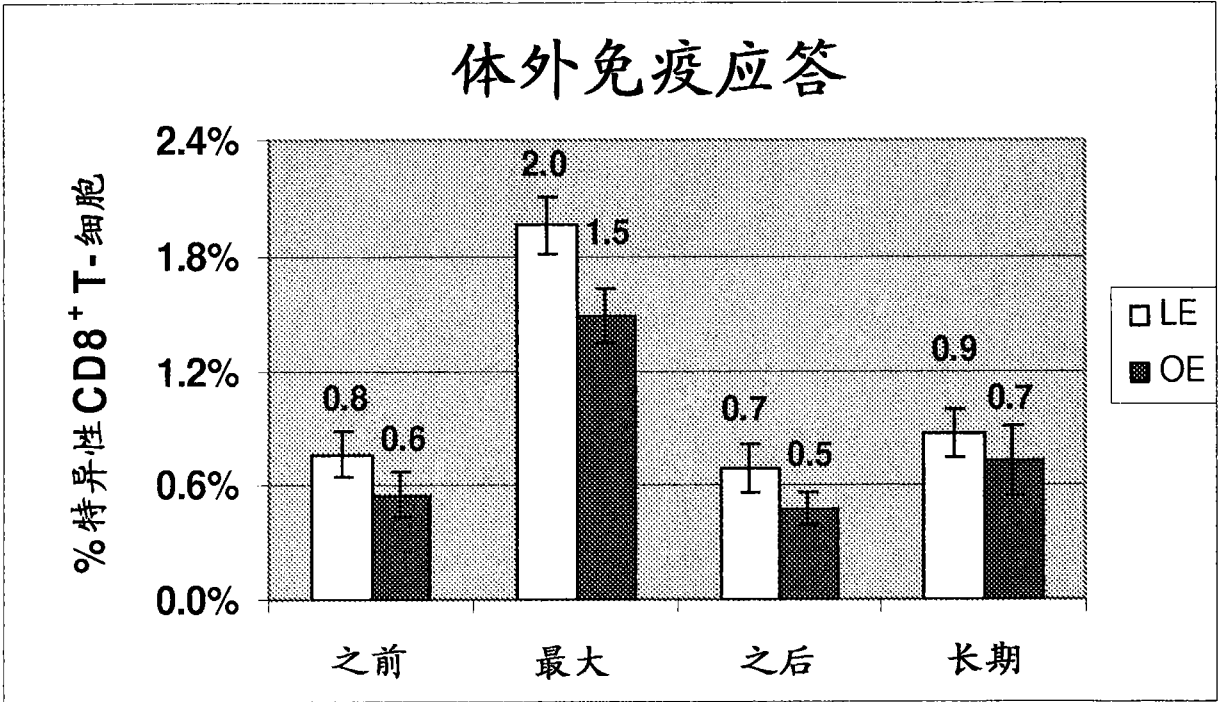


图 11A

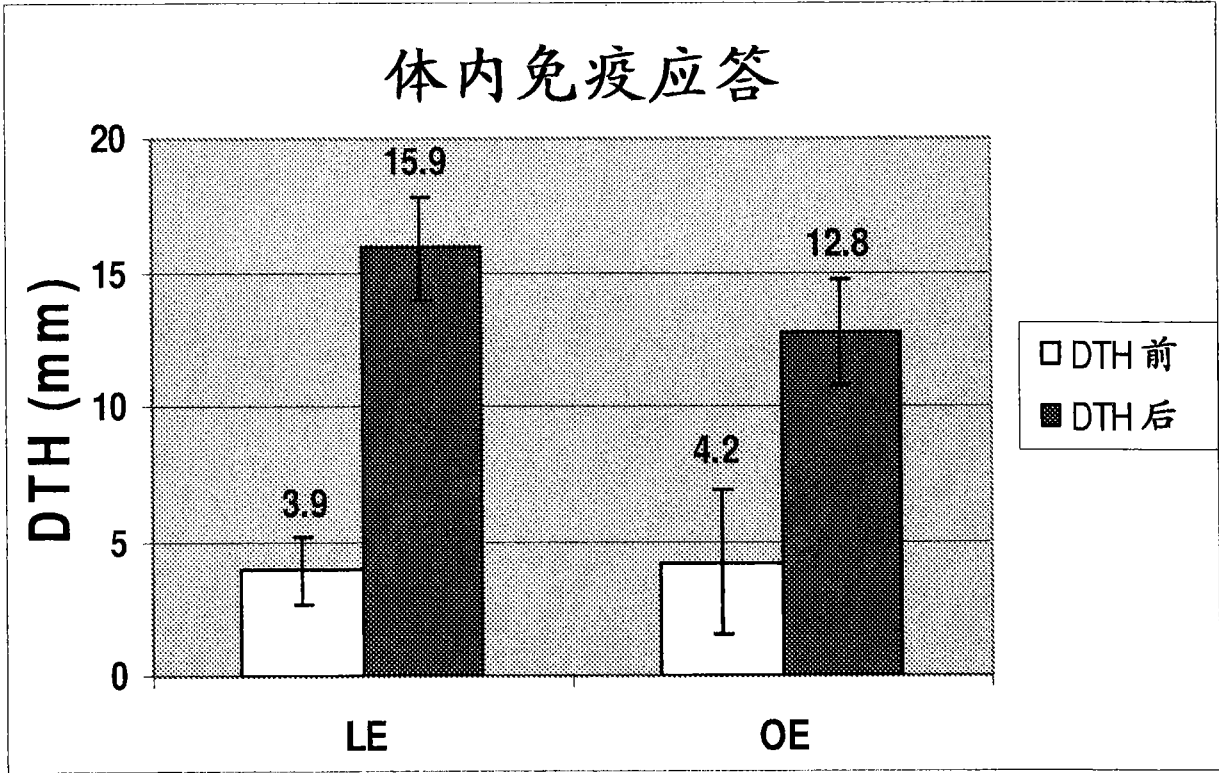


图 11B

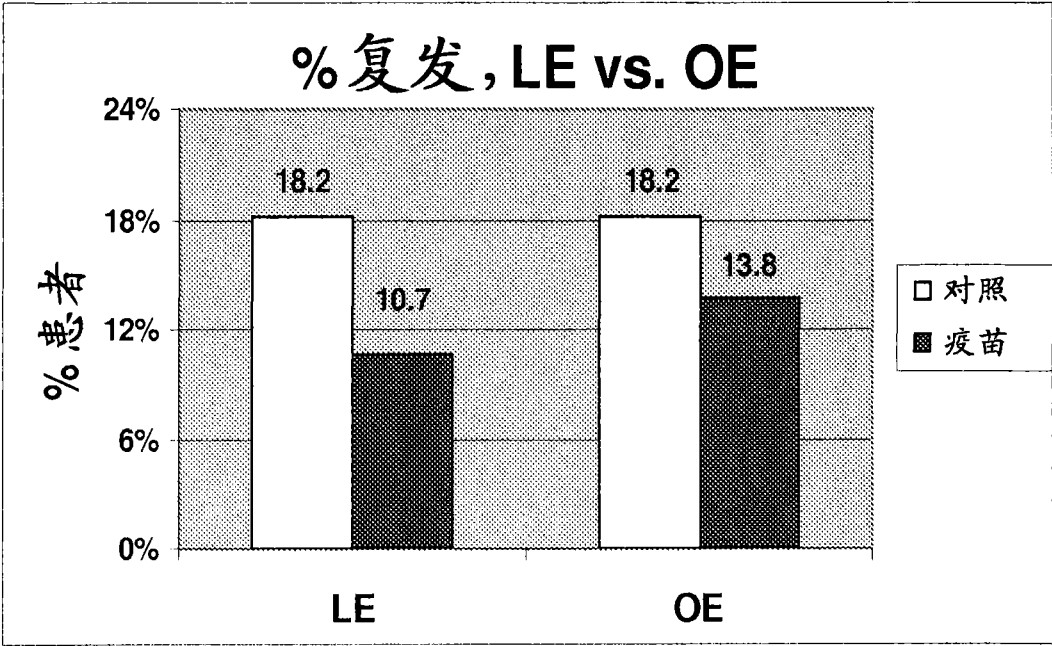


图 11C

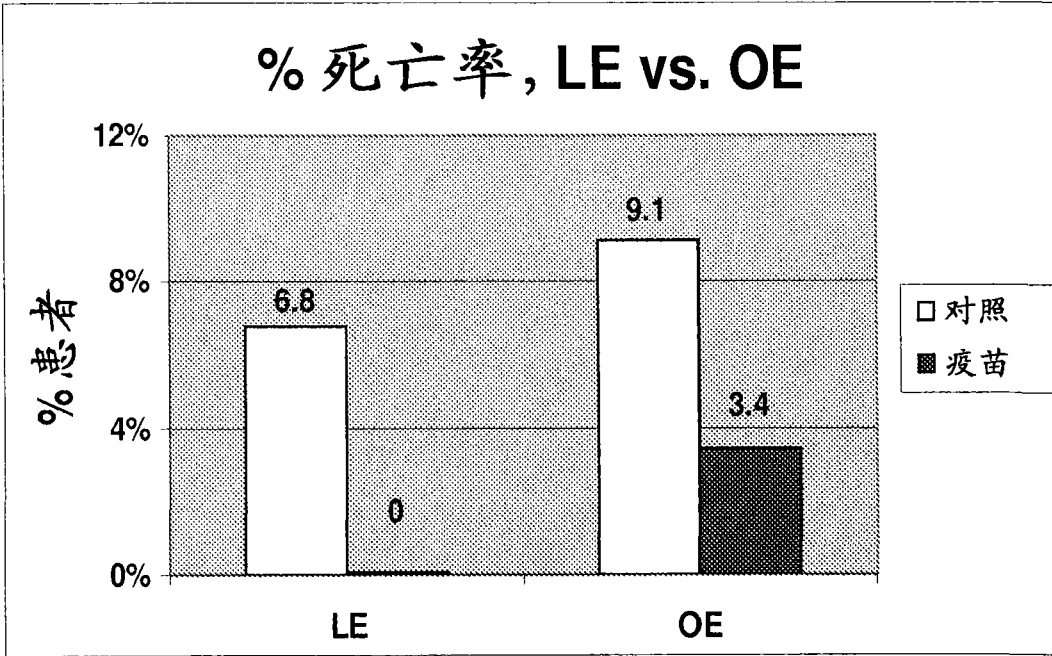


图 11D

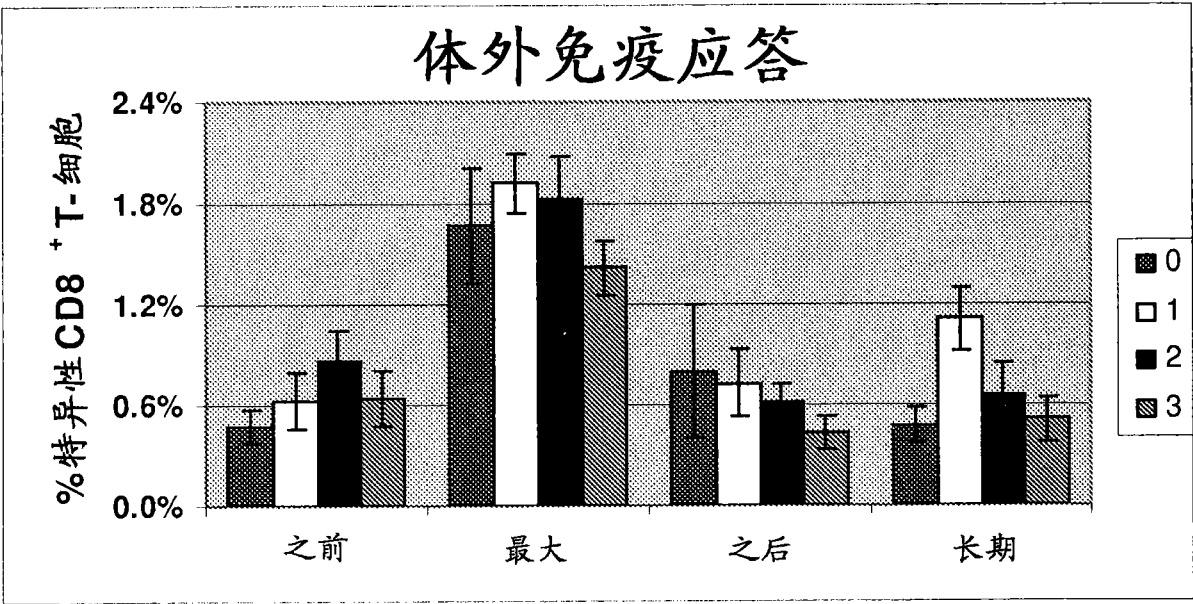


图 12A

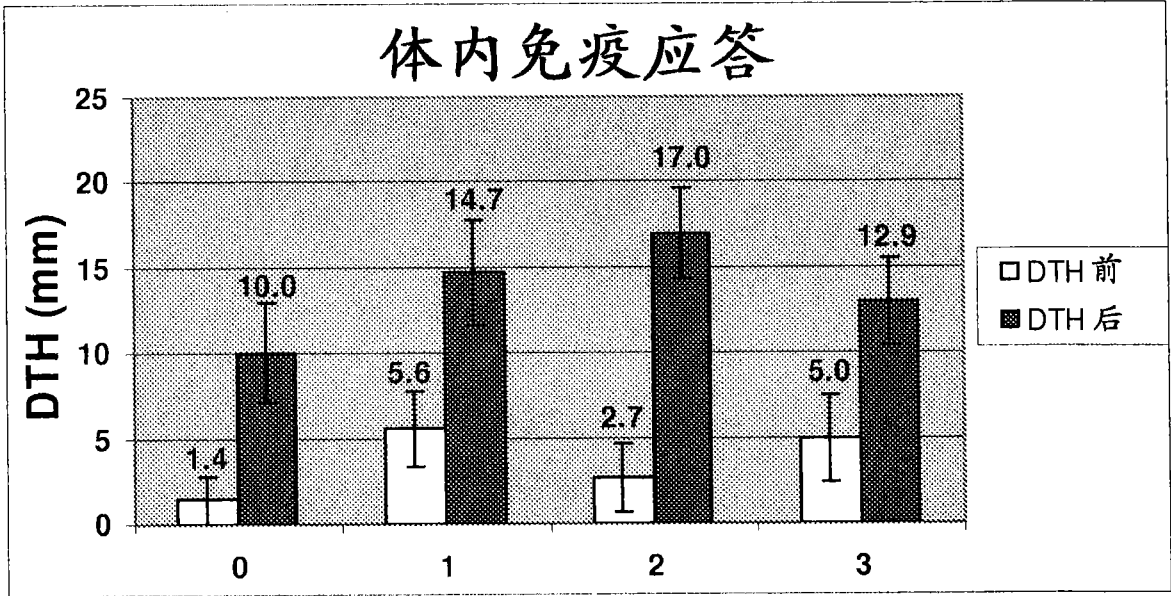


图 12B

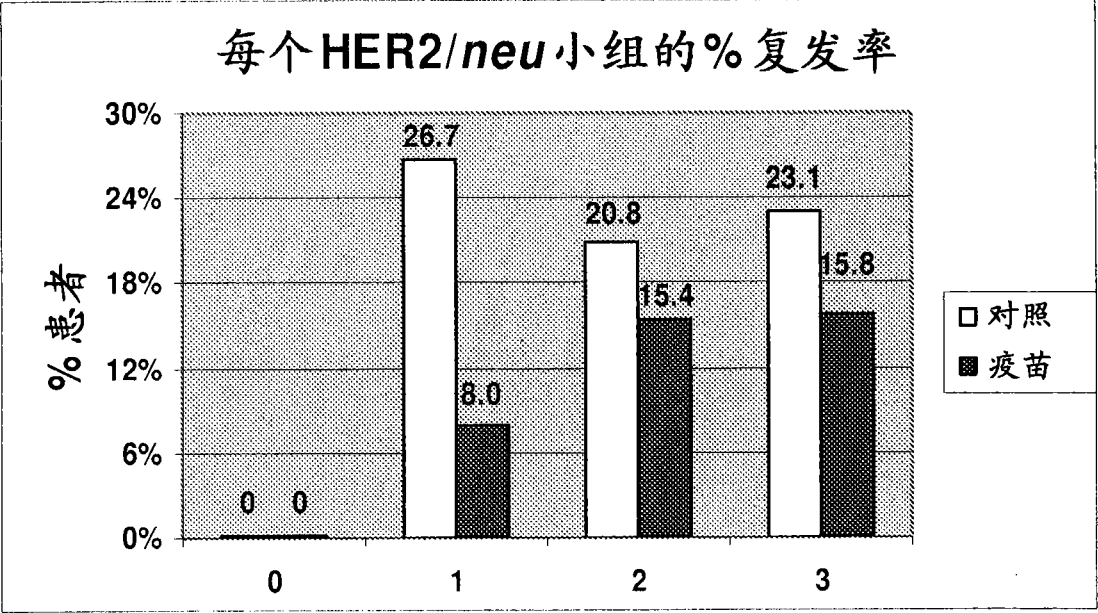


图 12C

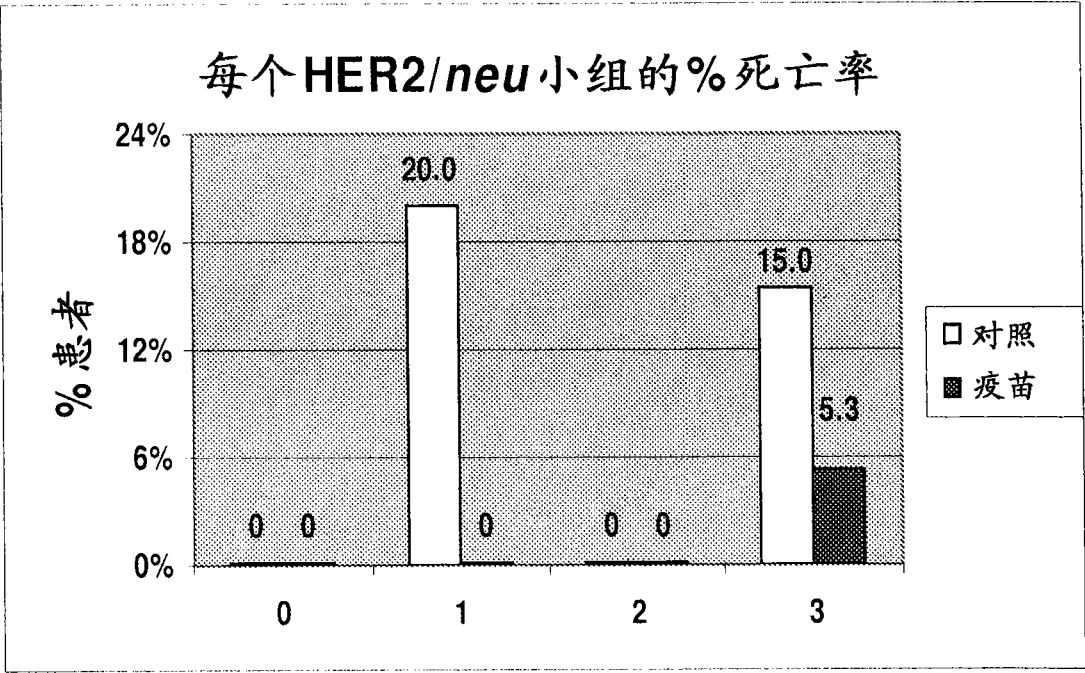


图 12D

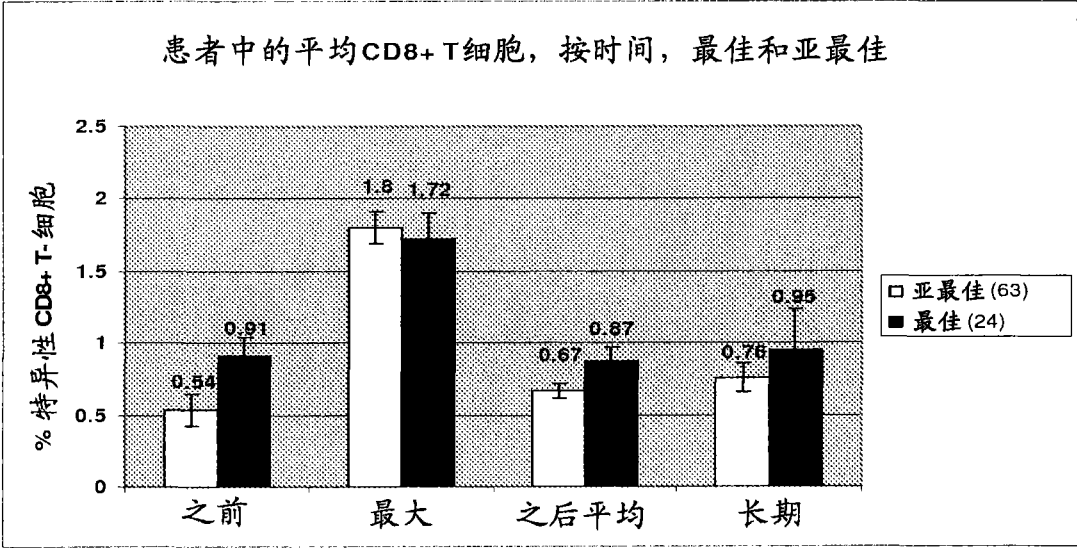


图 13A

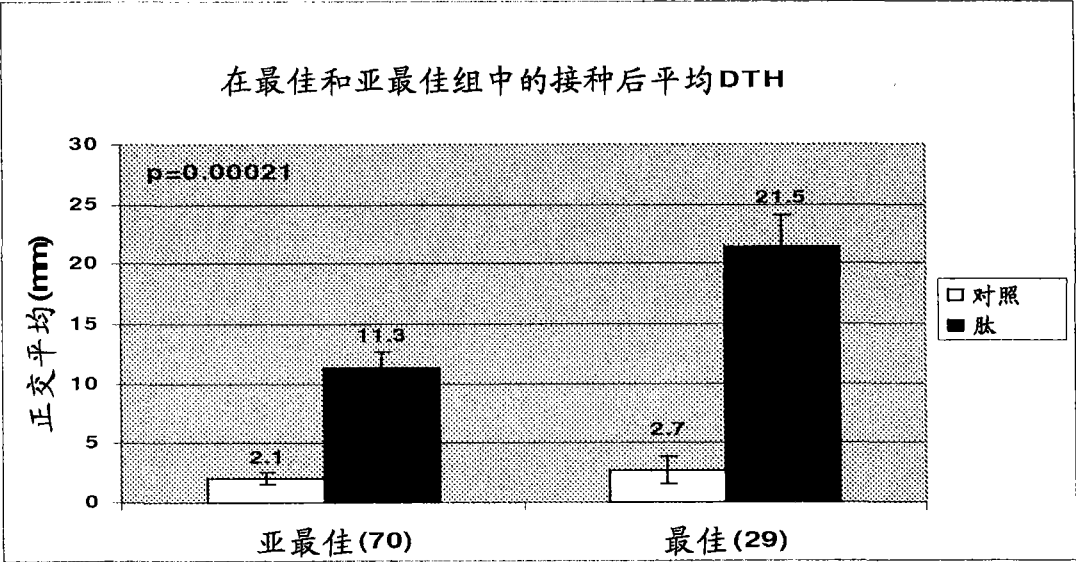


图 13B

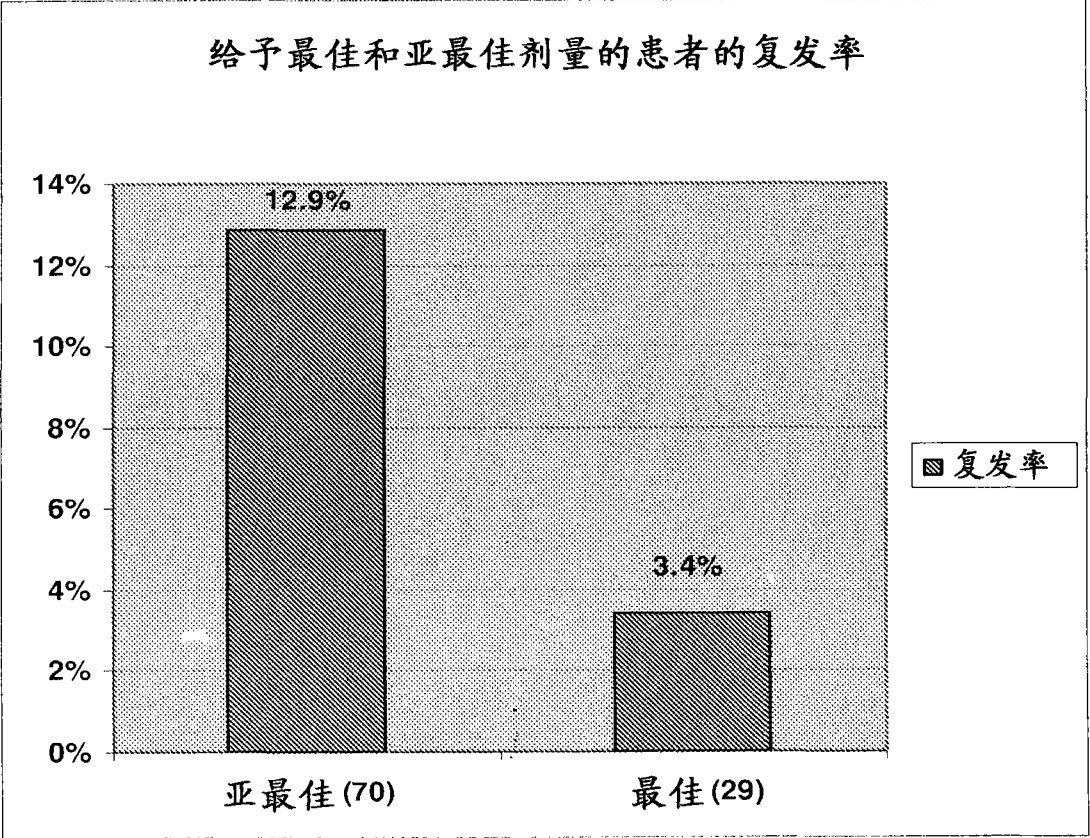


图 14