



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118184761 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202410352664.8

C12N 9/12 (2006.01)

(22) 申请日 2017.02.03

A61K 39/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/20 (2006.01)

62/291,601 2016.02.05 US

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201780020641.5 2017.02.03

(71) 申请人 因诺维奥制药公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 严健

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

专利代理师 李海霞

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书31页

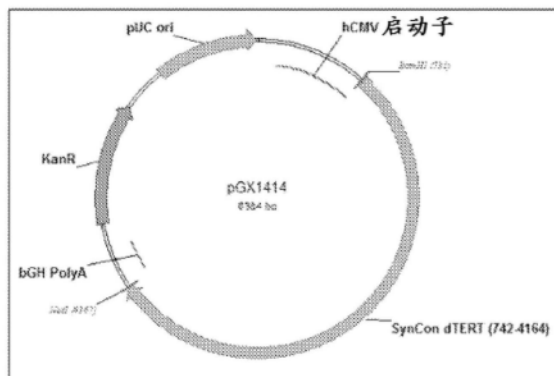
序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

癌症疫苗和使用其的治疗方法

(57) 摘要

本申请涉及癌症疫苗和使用其的治疗方法。本发明提供了一种包含编码狗端粒酶逆转录酶(dTERT)抗原的核酸分子的疫苗,以及在哺乳动物中使用所述疫苗诱导针对TERT的免疫响应和治疗癌症的方法。



1. 一种包含编码狗端粒酶逆转录酶抗原的多核苷酸序列的核酸分子,其中所述多核苷酸序列选自以下组成的组:

SEQ ID NO:4的多核苷酸序列;

与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的多核苷酸序列;

编码SEQ ID NO:5的氨基酸序列的多核苷酸序列;以及

编码与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列。

2. 一种包含权利要求1所述的核酸分子的质粒。

3. 一种包含权利要求2所述的质粒的疫苗。

4. 如权利要求3所述的疫苗,其还包含佐剂。

5. 如权利要求4所述的疫苗,其中所述佐剂是IL-12、IL-15、IL-28或RANTES。

6. 权利要求2所述的质粒在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

7. 权利要求2所述的质粒在制备用于诱导免疫响应的疫苗中的应用。

8. 一种狗端粒酶逆转录酶抗原,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的氨基酸序列。

癌症疫苗和使用其的治疗方法

[0001] 本申请是申请日为2017年2月3日的题为“癌症疫苗和使用其的治疗方法”的中国专利申请No.201780020641.5的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请要求2016年2月5日提交的美国临时专利申请号62/291,601的优先权,所述临时专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0004] 以引用的方式并入电子提交材料

[0005] 以引用的方式整体并入的是与此同时提交,并且如下标识的计算机可读核苷酸/氨基酸序列表:2017年2月3日创建的一个名为“VGX0151W0_ST25.txt”的47,931字节的ASCII(文本)文件。

技术领域

[0006] 本文公开了用于治疗癌症的组合物和方法以及治疗并提供针对肿瘤生长的保护的疫苗。

背景技术

[0007] 癌症是世界范围内的主要死因之一,并且在美国,癌症是第二大常见死因,几乎占每四例死亡中的一例。癌症起源于从正常细胞转变为肿瘤细胞的单个细胞。这种转变常常是多阶段过程,其从癌前病变进展到恶性肿瘤。多种因素促成了这种进展,包括衰老、遗传贡献以及暴露于外部因素,诸如物理致癌物(例如,紫外线和电离辐射)、化学致癌物(例如,石棉、烟草烟雾组分等)和生物致癌物(例如,某些病毒、细菌和寄生虫)。

[0008] 癌症的预防、诊断和治疗可采取许多不同的形式。预防可包括筛选素因性因子(例如,特定遗传变异体)、改变行为(例如,吸烟、饮食和身体活动量)和针对病毒的疫苗接种(例如,人乳头瘤病毒乙型肝炎病毒)。治疗可包括化学疗法、放射疗法和手术切除肿瘤或癌性组织。尽管许多预防和治疗方法是可用的,但此类方法在有效预防和/或治疗手头的癌症方面常常得到有限的成果。

[0009] 因此,需要鉴定和开发用于预防和/或治疗癌症的组合物和方法。此外,需要更有效的治疗来在患有癌症的受试者中延迟疾病进展和/或降低死亡率。

发明内容

[0010] 本发明的方面包括包含编码端粒酶逆转录酶癌抗原的核酸分子的疫苗。疫苗包含选自以下组成的组的多核苷酸序列:SEQ ID NO:1的多核苷酸序列、与SEQ ID NO:1至少95%相同的多核苷酸序列;编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多核苷酸序列;和编码与SEQ ID NO:2至少95%相同的氨基酸序列的多核苷酸序列或其任何组合。

[0011] 本发明的其他方面包括在哺乳动物中诱导针对端粒酶逆转录酶(TERT)的免疫响应的方法,所述方法包括向有需要的哺乳动物施用如权利要求1所述的疫苗,由此核酸分子在哺乳动物中表达并且在哺乳动物中诱导以下免疫响应中的一种或多种:(a) 特异于TERT

的体液免疫响应, (b) 炎性响应, 包括与未治疗的哺乳动物相比, 增加的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 水平, 和 (c) 特异于TERT的细胞免疫响应。

[0012] 本发明的一些方面还包括在哺乳动物中治疗癌症的方法, 所述方法包括向有需要的哺乳动物施用一种包含上述疫苗和药学上可接受的载体 (carrier) 的组合物, 由此多核苷酸在哺乳动物中表达并且癌症得到治疗。

附图说明

[0013] 本文公开并且如附图中进一步描述的序列如下:

[0014] SEQ ID NO:1对应于合成共有 (SYNCON) dTERT。

[0015] SEQ ID NO:2对应于由SEQ ID NO:1编码的氨基酸序列。

[0016] SEQ ID NO:3对应于质粒pGX1414 (含有SEQ ID NO:1作为插入物的pGX0001) 的核酸序列。

[0017] SEQ ID NO:4对应于编码dTERT-PL (SEQ ID NO:5) 的核酸序列, 其是狗端粒酶逆转录酶 (dTERT) 多肽, 其具有消除端粒酶活性的七个点突变 (取代: R579Y、D996Y、K633A、R638A、D719A、Y724A和D876A)。SEQ ID NO:4是pGX1415插入物。

[0018] SEQ ID NO:5 (dTERT-PL) 对应于由SEQ ID NO:4编码的氨基酸序列。

[0019] SEQ ID NO:6对应于SEQ ID NO:5的免疫显性表位。

[0020] SEQ ID NO:7对应于dTERT的氨基酸序列。

[0021] 图1是实施例1中描述的质粒载体pGX1414 (SEQ ID NO:3) 的图。

[0022] 图2是实施例1中描述的质粒载体pGX0001的图。

[0023] 图3-A是如实施例2中所述的小鼠中pGX1414 (SEQ ID NO:3) 免疫程序的图。图3-B是说明由pGX1414 (SEQ ID NO:3) 诱导的总SYNCON dTERT (SEQ ID NO:1) 特异性IFN- γ 响应的图。图3-C是说明由pGX1414诱导的总天然dTERT特异性IFN- γ 响应的图。在用pGX1414进行四次免疫后, IFN- γ 分泌细胞/ 10^6 个脾细胞的频率通过IFN- γ ELISpot测定法测定。用SYNCON dTERT肽 (SEQ ID NO:2) 或天然dTERT肽 (SEQ ID NO:7) 刺激来自每只小鼠的脾细胞 (每组5只小鼠)。结果呈现为平均值 \pm SEM。

[0024] 图4示出来自狗TERT疫苗接种程序的酶联免疫斑点 (ELISpot) 结果。用pGX1414以10mg/ml免疫7只狗。结果在第0周 (无免疫, 前取血)、第4周 (前取血后免疫#1)、第8周 (前取血后免疫#2) 和第12周 (前取血后免疫#3) 示出。结果显示TERT DNA疫苗接种诱导狗的细胞介导的免疫响应。

[0025] 图5-A是质粒载体pGX1415的图, 其是含有SEQ ID NO:4作为插入物的质粒载体pGX0001。图5-B示出用所述酶消化的质粒pGX1415的凝胶电泳结果。

[0026] 图6示出转染细胞中狗TERT-PL (SEQ ID NO:4, 其编码SEQ ID NO:5) 的高水平表达。用编码SEQ ID NO:5的pVax1或狗TERT-PL DNA构建体 (10 μ g) 转染293T细胞。转染后2天, 固定细胞并用抗TERT抗体染色以在转染细胞中表达TERT。

[0027] 图7是dTERT-PL的免疫程序 (作为pGX1415施用) 的图。

[0028] 图8示出由dTERT-PL (作为pGX1415施用) 疫苗诱导的细胞免疫响应是小鼠。在C57BL/6小鼠中检查由dTERT-PL (pGX1415) 诱导的细胞免疫响应。在由疫苗 (25 μ g) 进行第三次免疫后一周, 总dTERT特异性IFN- γ 响应。分别用dTERT肽库刺激来自每只小鼠的脾细胞

(每组4只小鼠)。数据表明在dTERT-PL DNA疫苗接种后长期持续存在免疫响应。结果呈现组合肽库为平均值 \pm SEM。

[0029] 图9示出在C57/BL6小鼠中dTERT-PL (pGX1415) DNA疫苗的显性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位的预测。在用电穿孔进行三次疫苗接种后,狗特异性dTERT-PL DNA质粒在小鼠中引发显著的细胞免疫响应。在脾中观察到高水平的狗TERT的IFN- γ T细胞特异性免疫显性和亚优势表位。鉴定了表位FNSVHLRELSEAEVR (SEQ ID NO:6) (通过使用ELISpot的表位作图)作为dTERT-PL DNA疫苗的免疫显性表位。矩阵池的数量在X轴上标识。

[0030] 图10示出用表达狗TERT (SEQ ID NO:5)的DNA构建体 (pGX1415)免疫后的体液免疫响应。(A)通过酶联免疫吸附测定(ELISA)示出免疫小鼠血清中的总IgG抗体层。用50 μ g的dTERT-PL DNA免疫每组小鼠(n=5)。(B)通过免疫荧光测定(IFA)在用编码dTERT的DNA质粒疫苗转染、用来自小鼠的免疫血清处理的293T细胞中检测特异性。与pVax1血清相比,在dTERT-PL疫苗接种的小鼠血清中观察到通过ELISA的抗TERT总IgG水平和通过IFA的特异性。

具体实施方式

[0031] 本发明的方面包括可定制以治疗或预防特定癌症和肿瘤的疫苗。已针对从家犬(*Canis familiaris*) (狗)分离的癌症相关抗原端粒酶逆转录酶设计了抗原,在本文中称为狗TERT、狗-TERT或dTERT。例如,已针对癌症相关抗原dTERT设计了抗原共有(例如SEQ ID NO:4,其编码SEQ ID NO:5)序列。犬癌症的发生率与人类相似,并且与人类癌症具有许多共同特征,包括例如组织学外观、肿瘤遗传学、生物学行为和对常规疗法的响应。如在人类中观察到的,TERT活性主要局限于肿瘤组织并且在大多数正常狗组织中不存在。因此,本发明利用dTERT共有序列作为哺乳动物,尤其是犬中的癌症免疫疗法的抗原。dTERT抗原可在本发明疫苗中与其他癌症相关抗原组合使用,例如像酪氨酸酶(Tyr)、在黑素瘤中优先表达的抗原(PRAME)、酪氨酸酶相关蛋白1(Tyrp1)、癌症睾丸抗原(NY-ESO-1)、乙型肝炎病毒抗原和维尔姆斯氏肿瘤1抗原(WT-1),以允许定制特定癌症的疫苗预防和治疗。疫苗可提供特定癌抗原的任何组合,用于特定预防或治疗需要治疗的受试者的癌症。

[0032] 重组癌抗原可诱导抗原特异性T细胞和/或高滴度抗体响应,从而诱导或引发针对癌症或表达抗原的肿瘤或对其具有反应性的免疫响应。在一些实施方案中,诱导或引发的免疫响应可以是细胞免疫响应、体液免疫响应或细胞和体液免疫响应两者。在一些实施方案中,诱导或引发的细胞免疫响应可包括干扰素- γ (IFN- γ)和/或肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的诱导或分泌。在其他实施方案中,诱导或引发的免疫响应可减少或抑制促进肿瘤或表达抗原的癌症生长的一种或多种免疫抑制因子,例如但不限于:下调MHC呈递的因子,上调抗原特异性调节性T细胞(Treg)、PD-L1、FasL、细胞因子诸如IL-10和TFG- β 、肿瘤相关巨噬细胞、肿瘤相关成纤维细胞的因子,由免疫抑制细胞、CTLA-4、PD-1、MDSC、MCP-1和免疫检查点分子产生的可溶性因子。

[0033] 1. 定义

[0034] 除非另外定义,否则本文所用的全部技术和科学术语都具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。当发生冲突时,以本文件(包括定义)为准。虽然在本发明的实践或测试中可使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但以下描述了优选

的方法和材料。本文提及的所有公布、专利申请、专利以及其他参考文献以引用的方式整体并入。本文公开的材料、方法和实施例仅是示例性的,并不意图为限制性的。本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不意图为限制性的。

[0035] 如本文所用,术语“包含(comprise)”、“包括(include)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“可(can)”、“含有(contain)”以及其变化形式意图是不排除另外行为或结构的可能性的开放式连接词、术语或词语。除非上下文另外清楚地说明,否则单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述(the)”包括复数引用。本公开还涵盖“包括本文所呈现的实施方案或要素”、“由本文所呈现的实施方案或要素组成”以及“主要由本文所呈现的实施方案或要素组成”的其他实施方案,无论是否明确地提出。

[0036] 对于本文所列举的数值范围,明确涵盖了在其间具有相同精密度的每个居间的数字。例如,对于范围6-9,除6和9之外还涵盖数字7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确涵盖数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0037] 如本文所用的“佐剂”意指被添加到本文所述的DNA质粒疫苗中来增强由下文所述的DNA质粒和编码核酸序列所编码的抗原的免疫原性的任何分子。

[0038] 如本文所用的“抗体”意指类型IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的抗体,或其片段或衍生物,包括Fab、F(ab')₂、Fd以及单链抗体、双链抗体、双特异性抗体、双功能抗体及其衍生物。所述抗体可以是从小哺乳动物的血清样本中分离出的抗体、多克隆抗体、亲和纯化抗体或其混合物,所述混合物对所需的表位或从其衍生的序列表现出足够的结合特异性。

[0039] 如本文所用的“编码序列”或“编码核酸”意指包含编码蛋白质的核苷酸序列的核酸(RNA或DNA分子)。所述编码序列可进一步包括可操作地连接至调控元件的起始信号和终止信号,所述调控元件包括能够在施用核酸的个体或哺乳动物的细胞中指导表达的启动子和聚腺苷酸化信号。

[0040] 如本文所用的“互补序列”或“互补”意指,可意味着核酸分子的核苷酸或核苷酸类似物之间的Watson-Crick(例如,A-T/U和C-G)或Hoogsteen碱基配对的核酸。

[0041] 如本文所用的“共有”或“共有序列”意指基于分析来自不同生物体的相同基因的多个序列的比对的多肽序列。可制备编码共有多肽序列的核酸序列。包含蛋白质的疫苗可用于诱导针对抗原的广泛免疫,所述疫苗包含编码这些蛋白质的共有序列和/或核酸分子。

[0042] 如本文可互换使用的“电穿孔”、“电-透化作用”或“电动增强”(“EP”)意指使用跨膜电场脉冲来诱导在生物膜中的微观途径(孔隙);它们的存在允许生物分子如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子以及水从细胞膜的一侧流动到另一侧。

[0043] 如本文所用的相对于核酸序列的“片段”意指核酸序列或其一部分,其编码能够在与本文所公开的抗原发生交叉反应的哺乳动物中引发免疫响应的多肽。所述片段可以是选自编码以下所列出的蛋白质片段的各种核苷酸序列中的至少一种的DNA片段。片段可包含至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的一种或多种以下所列出的核酸序列。

[0044] 就多肽序列来说,“片段”或“免疫原性片段”意指能够在与本文所公开的抗原发生交叉反应的哺乳动物中引发免疫响应的多肽。片段可以是选自以下各种氨基酸序列中的至少一种的多肽片段。共有蛋白的片段可包含共有蛋白的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

[0045] 如本文所用,术语“遗传构建体”是指包含编码蛋白质的核苷酸序列的DNA或RNA分子。所述编码序列包括可操作地连接至调控元件的起始信号和终止信号,所述调控元件包括能够在施用核酸分子的个体的细胞中指导表达的启动子和聚腺苷酸化信号。如本文所使用的,术语“可表达的形式”是指含有可操作地连接至编码蛋白质的编码序列的必需调控元件的基因构建体,以使得当存在于个体的细胞中时,编码序列将被表达。

[0046] 如本文所用的术语“同源性”是指互补性程度。可存在部分同源性或完全同源性(即,同一性)。至少部分抑制完全互补序列杂交于靶标核酸的部分互补序列是使用功能性术语“基本上同源”来提及。当关于诸如cDNA或基因组克隆的双链核酸序列使用时,如本文所用的术语“基本上同源”是指探针可在低严格性条件下杂交于双链核酸序列的链。当关于单链核酸序列使用时,如本文所用的术语“基本上同源”是指探针可在低严格性条件下杂交于单链核酸模板序列(即,是单链核酸模板序列的互补序列)。

[0047] 如本文所用,术语“免疫检查点抑制剂”是指防止免疫系统中任何组分受到抑制的任何核酸或蛋白质,诸如MHC类别呈递、T细胞呈递和/或分化、B细胞呈递和/或分化,以及用于免疫细胞增殖和/或分化的细胞因子、趋化因子或信号传导。

[0048] 如本文在两种或更多种核酸或多肽序列的背景下所使用的术语“相同的”或“同一性”意指在指定区域中序列具有相同残基的指定百分比。可通过以下来计算所述百分比:最佳地比对两个序列、在指定区域比较两个序列、确定在两个序列中相同的残基的位置的数量以产生匹配位置的数量、以匹配位置的数量除以在指定区域内的位置的总数量,并且将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。在两个序列具有不同的长度或者比对产生一个或多个交错的末端并且比较的指定区域仅包括单一序列的情况下,单一序列的残基被包括在计算的分母中而不是分子中。当比较DNA和RNA时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可被认为是等同的。同一性可手动地或者通过使用计算机序列算法诸如BLAST或者BLAST 2.0来执行。

[0049] 如本文所用的“免疫响应”意指响应于抗原的引入而产生的宿主的免疫系统(例如,哺乳动物的免疫系统)的活化。所述免疫响应可以是细胞响应或体液响应或两者的形式。

[0050] 如本文所用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”意指共价连接在一起的至少两个核苷酸。单链的描述还定义了互补链的序列。因此,核酸还涵盖了所描绘的单链的互补链。核酸的很多变体可被用于与给定的核酸相同的目的。因此,核酸还涵盖了基本上相同的核酸和其互补体。单链提供可与靶序列在严格杂交条件下杂交的探针。因此,核酸还涵盖了在严格杂交条件下杂交的探针。

[0051] 核酸可以是单链的或者双链的或可含有双链或者单链序列两者的部分。所述核酸可以是DNA、基因组和cDNA两者、RNA或杂合体,其中所述核酸可含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的组合,以及包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤次黄嘌呤、异胞嘧啶以及异鸟嘌呤的碱基的组合。核酸可通过化学合成方法或者通过重组方法来获得。

[0052] 如本文所用的“可操作地连接”意指基因的表达是在空间上与之连接的启动子的控制下进行的。在其控制下,启动子可被定位在基因的5'(上游)或者3'(下游)。所述启动子和基因之间的距离可大约与所述启动子和其在启动子中衍化的基因中所控制的基因之间的距离相同。如本领域所已知,这个距离的变化可在没有失去启动子功能的情况下进行

调整。

[0053] 如本文所用的“肽”、“蛋白质”或“多肽”可意指氨基酸的连接序列,并且可以是天然的、合成的、或天然与合成的修饰或组合。

[0054] 如本文所用的“启动子”意指合成的或天然来源的分子,所述分子能够赋予、活化或增强细胞中的核酸的表达。启动子可包含一个或多个特定的转录调控序列以便进一步增强表达和/或改变其空间的表达和/或时间的表达。启动子还可包含远端增强子或阻遏元件,它们可位于从转录的起始点开始的差不多几千对碱基对处。启动子可从包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫以及动物的来源中获得。启动子可调控基因组分相对于其中发生表达的细胞、组织或器官或相对于发生表达所处的发育阶段或响应于外部刺激(诸如生理应激、病原体、金属离子或诱导剂)而组成型地或差异性地表达。启动子的代表性实例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、乳糖操纵子-启动子、tac启动子、SV40后期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV40后期启动子以及CMV IE启动子。

[0055] “信号肽”和“前导序列”在本文可互换使用并且是指可被连接在本文所列出的蛋白质的氨基末端的氨基酸序列。信号肽/前导序列通常指示蛋白质的位置。本文所用的信号肽/前导序列优选地促进蛋白质从产生其的细胞中分泌。信号肽/前导序列常常从蛋白质的剩余部分裂解,所述蛋白质在从细胞分泌后经常被称为成熟蛋白质。信号肽/前导序列连接在蛋白质的氨基末端(即,N末端)。

[0056] 如本文所用的“严格杂交条件”意指这样的条件,即在所述条件下诸如在核酸的复杂混合物中第一核酸序列(例如,探针)将与第二核酸序列(例如,靶标)进行杂交。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下将有所不同。严格条件可被选择为在限定的离子强度pH下低于特定序列的热熔点(T_m)约 5°C - 10°C 。 T_m 可以是在所述温度下处于平衡时50%互补于靶标的探针杂交于靶标序列(因为靶标序列过量存在,所以在 T_m 下,在平衡时50%的探针被占据)的温度(在限定的离子强度、pH以及核酸浓度下)。严格条件可以是其中在pH 7.0至8.3下盐浓度小于约1.0M钠离子,诸如约0.01-1.0M钠离子浓度(或其他盐),并且针对短探针(例如,约10-50个核苷酸)的温度为至少约 30°C ,且针对长探针(例如,大于约50个核苷酸)的温度为至少约 60°C 的那些条件。严格条件还可通过添加去稳定剂诸如甲酰胺来实现。对于选择性或特异性杂交,阳性信号可为本底杂交的至少2至10倍。示例性的严格杂交条件包括以下:50%甲酰胺、5x SSC以及1%SDS、在 42°C 下孵育,或者5x SSC、1%SDS、在 65°C 下孵育、在 65°C 下用0.2x SSC和0.1%SDS洗涤。

[0057] 如本文所用的“受试者”可意指想要或需要用本文所描述的疫苗进行免疫的哺乳动物。哺乳动物可以是狗、人、黑猩猩、猫、马、牛、小鼠或大鼠。

[0058] 如本文所用的“基本上互补”意指第一序列在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、180、270、360、450、540或更多个核苷酸或氨基酸的区域上与第二序列的互补序列至少60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同,或者意指两个序列在严格杂交条件下进行杂交。

[0059] 如本文所用的“基本上相同”意指第一序列和第二序列在8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、180、270、360、450、540或更多个核苷酸或氨基酸的区域内是至少60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的,或者就核酸而言,如果第一序列与第二序列的互补体基本上互补,则第一序列和第二序列也这样相同。

[0060] 如本文所用的“治疗(Treatment)”或“治疗(treating)”可意指通过预防、抑制、阻遏的手段保护动物免于疾病或完全消除疾病。预防疾病涉及在疾病发作之前向动物施用本发明的疫苗。抑制疾病涉及在疾病诱发之后但在其临床出现之前向动物施用本发明的疫苗。阻遏疾病涉及在疾病的临床出现之后向动物施用本发明的疫苗。

[0061] 本文就核酸而言所用的“变体”意指(i)参考核苷酸序列的一部分或片段;(ii)参考核苷酸序列或其部分的互补体;(iii)与参考核酸或其互补体基本上相同的核酸;或者(iv)在严格条件下与参考核酸、其互补体或与其基本上相同的序列杂交的核酸。

[0062] 就肽或多肽而言的“变体”通过氨基酸的插入、缺失或保守性取代而在氨基酸序列上不同,但保留至少一种生物活性。变体还意指具有与参考蛋白质基本上相同的氨基酸序列的蛋白质,所述参考蛋白质具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列。氨基酸的保守性取代,即以相似特性(例如,亲水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸来替换氨基酸,在本领域中被认为通常涉及微小变化。这些微小变化可部分地通过考虑氨基酸的疏水性指数来鉴定,如本领域中所理解的(参见例如,Kyte等,J.Mol.Biol.,157:105-132(1982))。所述氨基酸的疏水性指数是基于其疏水性和电荷的考虑。本领域已知的是相似的疏水性指数的氨基酸可被取代并仍然保留蛋白质功能。在一个方面,疏水性指数为 ± 2 的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可用于揭示将产生保留生物功能的蛋白质的取代。在肽的背景下考虑氨基酸的亲水性允许计算所述肽的最大局部平均亲水性,这是一种已报道与抗原性和免疫原性很好地相关的可用测量(参见例如美国专利4,554,101)。如本领域所了解的,具有相似亲水性值的氨基酸的取代可产生保留生物活性(例如免疫原性)的肽。可用具有彼此在 ± 2 内的亲水性值的氨基酸进行取代。氨基酸的疏水性指数和亲水性值两者都受所述氨基酸的特定侧链影响。与所述观察一致的是,与生物功能相容的氨基酸取代被理解为取决于这些氨基酸相对的相似性,并且特别是那些氨基酸的侧链,如通过疏水性、亲水性、电荷、大小以及其他特性所揭示的。

[0063] 变体可以是在全基因序列或其片段的全长上大致相同的核酸序列。核酸序列可在基因序列或其片段的全长上80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。变体可以是在氨基酸序列或其片段的全长上大致相同的氨基酸序列。氨基酸序列可在氨基酸序列或其片段的全长上80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0064] 如本文所用的“载体”意指含有复制起点的核酸序列。载体可以是病毒载体、噬菌体、细菌人工染色体(BAC)或酵母人工染色体(YAC)。载体可以是DNA或RNA载体。载体可以是自我复制的染色体外载体,并优选地是DNA质粒。载体可含有或包括一个或多个异源核酸序列。

[0065] 2. 疫苗

[0066] 本发明涉及一种抗癌疫苗。疫苗可包含一种或多种癌抗原或者一种或多种编码如本文所述的一种或多种癌抗原的核酸分子。疫苗可预防肿瘤生长。疫苗可减少肿瘤生长。疫苗可预防肿瘤细胞的转移。在一些情况下,疫苗可有针对性地用于治疗肝癌、前列腺癌、黑色素瘤、血癌(例如,淋巴瘤、多发性骨髓瘤和白血病)、头颈癌、胶质母细胞瘤、复发性呼吸道乳头状瘤病(RRP)、肛门癌、宫颈癌、脑癌、肾细胞癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、睾丸癌、结肠癌、胆囊癌、喉癌、甲状腺癌、癌、唾液腺癌或胰腺癌。

[0067] 开发疫苗的第一步是鉴定免疫系统未识别并且是自身抗原的癌抗原。将鉴定的癌抗原从自身抗原变为外来抗原,以便被免疫系统识别。重组癌抗原的核酸和氨基酸序列从自身抗原到外来抗原的重新设计破坏了免疫系统对抗原的耐受性。为了破坏耐受性,可如下所述对癌抗原应用几种重新设计措施。

[0068] 一种用于设计编码共有癌抗原的重组核酸序列的方法是引入改变天然癌抗原的总氨基酸序列中的特定氨基酸的突变。突变的引入不会如此大地改变癌抗原,以至于它不能普遍应用于动物受试者,而是足以使得所得氨基酸序列破坏耐受性或被认为是外来抗原以便产生免疫响应地改变癌抗原。另一种方法可以是产生共有重组癌抗原,其与相应的天然癌抗原具有95%、96%、97%、98%、99%或更大的核酸或氨基酸序列同一性。天然癌抗原通常是与特定癌症或癌症肿瘤相关的抗原。取决于癌抗原,癌抗原的共有序列可跨哺乳动物物种或在物种的亚型内或跨病毒株或血清型。一些癌抗原没有从癌抗原的野生型氨基酸序列发生很大改变。一些癌抗原具有跨物种如此地不同以至于不能产生共有序列的核酸/氨基酸序列。在这些情况下,产生将破坏耐受性并产生免疫响应的重组癌抗原,其与相应的天然癌抗原具有95%、96%、97%、98%、99%或更大的核酸或氨基酸序列同一性。

[0069] 疫苗的重组癌抗原不被认为是自身的,因此破坏耐受性。耐受性的破坏可诱导抗原特异性T细胞和/或高滴度抗体响应,从而诱导或引发针对癌症或表达抗原的肿瘤或对其具有反应性的免疫响应。在一些实施方案中,诱导或引发的免疫响应可以是细胞响应、体液响应或细胞和体液免疫响应两者。在一些实施方案中,诱导或引发的细胞免疫响应可包括干扰素- γ (IFN- γ) 和/或肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的诱导或分泌。就这一点而言,与未接受疫苗的未治疗哺乳动物相比,本发明的疫苗可在哺乳动物中诱导包含增加的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 水平的免疫响应。在其他实施方案中,诱导或引发的免疫响应可减少或抑制促进肿瘤或表达抗原的癌症生长的一种或多种免疫抑制因子,例如但不限于:下调MHC呈递的因子,上调抗原特异性调节性T细胞(Treg)、PD-L1、FasL、细胞因子诸如IL-10和TFG- β 、肿瘤相关巨噬细胞、肿瘤相关成纤维细胞的因子,由免疫抑制细胞、CTLA-4、PD-1、MDSC、MCP-1和免疫检查点分子产生的可溶性因子。

[0070] 在具体实施方案中,疫苗可通过诱导以下来介导清除或防止肿瘤细胞的生长:(1) 通过B细胞响应的体液免疫,以产生阻断单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 产生的抗体,从而延迟髓源性抑制细胞(MDSC)并抑制肿瘤生长;(2) 增加细胞毒性T淋巴细胞,诸如CD8⁺ (CTL),以攻击并杀死肿瘤细胞;(3) 增加T辅助细胞响应;(4) 以及通过IFN- γ 和TFN- α 增加炎症响应,或优选所有上述响应。疫苗可使无肿瘤存活率提高30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%和45%。在免疫后,疫苗可使肿瘤肿块减少30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、

59%和60%。疫苗可预防和阻断单核细胞趋化蛋白1 (MCP-1) 的增加,其是由髓源性抑制细胞分泌的细胞因子。疫苗可使肿瘤存活率提高30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%和60%。

[0071] 与未施用疫苗的受试者中的细胞免疫响应相比,疫苗可使施用疫苗的受试者中的细胞免疫响应增加约50倍至约6000倍、约50倍至约5500倍、约50倍至约5000倍、约50倍至约4500倍、约100倍至约6000倍、约150倍至约6000倍、约200倍至约6000倍、约250倍至约6000倍或约300倍至约6000倍。在一些实施方案中,与未施用疫苗的受试者中的细胞免疫响应相比,疫苗可使施用疫苗的受试者中的细胞免疫响应增加约50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、1600倍、1700倍、1800倍、1900倍、2000倍、2100倍、2200倍、2300倍、2400倍、2500倍、2600倍、2700倍、2800倍、2900倍、3000倍、3100倍、3200倍、3300倍、3400倍、3500倍、3600倍、3700倍、3800倍、3900倍、4000倍、4100倍、4200倍、4300倍、4400倍、4500倍、4600倍、4700倍、4800倍、4900倍、5000倍、5100倍、5200倍、5300倍、5400倍、5500倍、5600倍、5700倍、5800倍、5900倍或6000倍。

[0072] 与未施用疫苗的受试者中的IFN- γ 水平相比,疫苗可使施用疫苗的受试者中的干扰素 γ (IFN- γ)水平增加约50倍至约6000倍、约50倍至约5500倍、约50倍至约5000倍、约50倍至约4500倍、约100倍至约6000倍、约150倍至约6000倍、约200倍至约6000倍、约250倍至约6000倍或约300倍至约6000倍。在一些实施方案中,与未施用疫苗的受试者中的IFN- γ 水平相比,疫苗可使施用疫苗的受试者中的IFN- γ 水平增加约50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、1600倍、1700倍、1800倍、1900倍、2000倍、2100倍、2200倍、2300倍、2400倍、2500倍、2600倍、2700倍、2800倍、2900倍、3000倍、3100倍、3200倍、3300倍、3400倍、3500倍、3600倍、3700倍、3800倍、3900倍、4000倍、4100倍、4200倍、4300倍、4400倍、4500倍、4600倍、4700倍、4800倍、4900倍、5000倍、5100倍、5200倍、5300倍、5400倍、5500倍、5600倍、5700倍、5800倍、5900倍或6000倍。

[0073] 疫苗可以是DNA疫苗。DNA疫苗公开在例如,美国专利5,593,972、5,739,118、5,817,637、5,830,876、5,962,428、5,981,505、5,580,859、5,703,055和5,676,594中。DNA疫苗还可包含抑制整合至染色体中的元件或试剂。

[0074] 疫苗可以是一种或多种癌抗原的RNA分子。可将RNA疫苗引入细胞中。

[0075] 本发明的疫苗可具有有效疫苗所要求的特征,诸如为安全的,使得疫苗本身不会引起疾病或死亡;保护免受疾病;诱导中和抗体;诱导保护性T细胞响应;以及提供施用容易性、很少副作用、生物稳定性和每剂量的低成本。通过含有如本文所讨论的癌抗原,疫苗可实现这些特征中的一些或全部。

[0076] a. dTERT

[0077] 本发明的疫苗可包含癌抗原dTERT、其片段或其变体。dTERT是狗(家犬)端粒酶逆转录酶,其在端粒末端上合成TTAGGG标签,以防止染色体缩短导致的细胞死亡。dTERT蛋白由1123个氨基酸残基组成,并且含有TERT家族成员的所有特征基序。与先前鉴定的哺乳动物TERT蛋白的序列比较表明,dTERT显示出与人TERT(hTERT)蛋白的最高水平的序列相似性

(参见例如,Nasir等,Gene,336(1):105-13(2004))。已鉴定了dTERT氨基酸序列,其中几个已保藏在GenBank数据库中(参见例如,GenBank登录号NP_001026800、NP_001026800.1、XP_004411686、XP_004768446、XP_004812556、EFB14781、XP_004812554、XP_004768447、XP_004440093、XP_004411687、XP_004812555、XP_004274558、NP_937983、AAC51724、NP_001177896、XP_004380340、NP_001039707、XP_003950543、NP_001231229和DAA17756)。过度增殖性犬细胞和人细胞可分别具有异常高的dTERT和hTERT表达。hTERT癌抗原进一步描述于例如,美国专利申请公布2014/0186384和国际专利申请公布WO 2014/144885中。

[0078] 另外,因为用hTERT基因转染的树突状细胞中的hTERT表达可以抗原特异性方式诱导CD8⁺细胞毒性T细胞并引发CD4⁺T细胞,因此这表明dTERT抗原可在抗原呈递细胞(APC)内表达,以延迟衰老并维持其在免疫治疗方法(诸如在本文所述的那些)中呈递选择的抗原的能力。

[0079] dTERT抗原可与任何数量的犬癌相关或由其表达,包括但不限于黑素瘤、前列腺癌、肝癌、宫颈癌、复发性呼吸道乳头状瘤病(RRP)、肛门癌、头颈癌、血癌(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、食道鳞状细胞癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、肝癌、脑癌(例如,胶质母细胞瘤)、胰腺癌、滑膜癌、睾丸癌和胃癌。因此,当包括本文所述的dTERT抗原时,本发明的疫苗可用于治疗患有任何上述癌症的哺乳动物受试者(例如,犬)。

[0080] dTERT抗原可诱导抗原特异性T细胞和/或高滴度抗体响应,从而诱导或引发针对癌症或表达抗原的肿瘤或对其具有反应性的免疫响应。在一些实施方案中,诱导或引发的免疫响应可以是细胞响应、体液响应或细胞和体液免疫响应两者。在一些实施方案中,诱导或引发的细胞免疫响应可包括干扰素- γ (IFN- γ)和/或肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的诱导或分泌。就这一点而言,与未接受疫苗的未治疗哺乳动物相比,本发明的疫苗可在哺乳动物中诱导包含增加的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)水平的炎性响应。在其他实施方案中,诱导或引发的免疫响应可减少或抑制促进肿瘤或表达抗原的癌症生长的一种或多种免疫抑制因子,例如但不限于:下调MHC呈递的因子,上调抗原特异性调节性T细胞(Treg)、PD-L1、FasL、细胞因子诸如IL-10和TFG- β 、肿瘤相关巨噬细胞、肿瘤相关成纤维细胞的因子,由免疫抑制细胞、CTLA-4、PD-1、MDSC、MCP-1和免疫检查点分子产生的可溶性因子。

[0081] dTERT抗原可包含使它们特别有效作为可诱导抗dTERT免疫响应所针对的免疫原的表位。例如,表位可包含氨基酸序列FNSVHLRELSEAEVR(SEQ ID NO:6)。表位可以是SEQ ID NO:6。dTERT抗原可包含全长dTERT翻译产物、其变体、其片段或其组合。在一个实施方案中,dTERT抗原包含共有氨基酸序列。

[0082] 可在密码子使用和相应的RNA转录物方面对编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸序列进行优化。编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可以是密码子和/或RNA优化的,用于在宿主,优选哺乳动物细胞中表达。在一些实施方案中,编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸序列可包括Kozak序列(例如,GCC ACC)以提高翻译的效率。编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可包括多个终止密码子(例如,TGA TGA)以提高翻译终止的效率。

[0083] 编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸还可编码免疫球蛋白E(IgE)前导序列。编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可进一步编码IgE前导序列,使得IgE前导序列的氨基酸序列通过肽键与dTERT抗原或共有dTERT抗原的氨基酸序列连接。在一些实施方案中,编

码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸不含或不含有编码IgE前导序列的核苷酸序列。

[0084] 在一些实施方案中,编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可以是异源核酸序列和/或含有一个或多个异源核酸序列。编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可相对于野生型dTERT抗原突变,使得dTERT抗原或共有dTERT抗原的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸或残基分别被另一个氨基酸或残基替换或取代。编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可相对于野生型dTERT抗原突变,使得dTERT抗原或共有dTERT抗原的氨基酸序列中的一个或多个残基分别被另一个残基替换或取代,从而导致在施用编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸、dTERT抗原或共有dTERT抗原或其组合的哺乳动物中,免疫系统不再耐受dTERT。在一个实施方案中,例如,编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸可相对于野生型dTERT抗原突变,使得dTERT氨基酸序列包含以下氨基酸取代中的一个或多个:R579Y、D996Y、K633A、R638A、D719A、Y724A和/或D876A。优选地,编码dTERT抗原或共有dTERT抗原的核酸相对于野生型dTERT抗原突变,使得dTERT氨基酸序列包含所有以下氨基酸取代:R579Y、D996Y、K633A、R638A、D719A、Y724A和D876A。不受任何特定理论的束缚,据信取代R579Y和D996Y参与破坏耐受性(参见例如,Gross等,J.Clin.Invest.,113:425-433(2004)),并且取代K633A、R638A、D719A、Y724A和D876A参与消除端粒酶活性(参见例如,Weinrich等,Nature Genetics,17:498-502(1997))。

[0085] 编码共有dTERT抗原的核酸序列可包含例如SEQ ID NO:1,其编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列。SEQ ID NO:1编码与IgE前导序列连接的dTERT蛋白。在其他实施方案中,dTERT蛋白可不含IgE前导序列或不与其连接。SEQ ID NO:1在图1中列出,并且SEQ ID NO:2在图2中列出。

[0086] 在一些实施方案中,编码dTERT抗原的核酸序列可包含在SEQ ID NO:1中所列出的核酸序列的整个长度上至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。在其他实施方案中,编码dTERT抗原的核酸序列可以是编码在SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列的整个长度上具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的核酸序列。dTERT抗原的氨基酸序列可以是在SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列的整个长度上具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0087] 一些实施方案涉及编码与dTERT蛋白、dTERT蛋白的免疫原性片段和同源蛋白的免疫原性片段同源的蛋白质的核酸序列。在其他实施方案中,本发明提供编码与序列具有高达95%同源性、与序列具有高达96%同源性、与序列具有高达97%同源性、与序列具有高达98%同源性、以及与序列具有高达99%同源性的免疫原性蛋白质的核酸分子。同样,还提供了编码本文所列出的免疫原性片段和与本文所列出的蛋白质同源的蛋白质的免疫原性片段的核酸序列。

[0088] 一些实施方案涉及编码与本文的核酸编码序列具有95%同源性的免疫原性蛋白质的核酸分子。一些实施方案涉及编码与本文的核酸编码序列具有96%同源性的免疫原性蛋白质的核酸分子。一些实施方案涉及编码与本文的核酸编码序列具有97%同源性的免疫原性蛋白质的核酸分子。一些实施方案涉及编码与本文的核酸编码序列具有98%同源性的

免疫原性蛋白质的核酸分子。一些实施方案涉及编码与本文的核酸编码序列具有99%同源性的免疫原性蛋白质的核酸分子。在一些实施方案中,具有与本文所公开的共有蛋白的编码序列同源的本文所公开的编码序列的核酸分子包括编码与编码本文所公开的同源蛋白序列的编码序列的5'末端连接的IgE前导序列的序列。

[0089] 一些实施方案涉及编码与全长dTERT蛋白、dTERT蛋白的免疫原性片段,以及与dTERT蛋白具有同一性的蛋白质的免疫原性片段具有特定百分比同一性的蛋白质的核酸序列。在其他实施方案中,本发明提供了编码与全长dTERT序列具有高达80%同一性、与全长dTERT序列具有高达85%同一性、与全长dTERT序列具有高达90%同一性、与全长dTERT序列具有高达91%同一性、与全长dTERT序列具有高达92%同一性、与全长dTERT序列具有高达93%同一性、与全长dTERT序列具有高达94%同一性、与全长dTERT序列具有高达95%同一性、与全长dTERT序列具有高达96%同一性、与全长dTERT序列具有高达97%同一性、与全长dTERT序列具有高达98%同一性,以及与全长dTERT序列具有高达99%同一性的免疫原性蛋白质的核酸分子。同样,还提供了编码本文所列出的免疫原性片段和与本文所列出的dTERT蛋白具有如上指示的类似同一性百分比的蛋白质的免疫原性片段的核酸序列。

[0090] 一些实施方案涉及SEQ ID NO:1的片段。片段可以是至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的SEQ ID NO:1。片段可与SEQ ID NO:1的片段至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源。片段可与SEQ ID NO:1的片段至少80%、至少85%、至少90%至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在一些实施方案中,片段包括编码前导序列(例如像免疫球蛋白前导物,诸如IgE前导物)的序列。在一些实施方案中,片段不含编码前导序列的编码序列。在一些实施方案中,片段不含编码前导序列,例如像IgE前导物的编码序列。

[0091] 在另一个实施方案中,dTERT抗原的氨基酸序列包含SEQ ID NO:2,其包含与IgE前导物连接的dTERT蛋白的氨基酸序列。与IgE前导物连接的dTERT蛋白的氨基酸序列还可与人流感血凝素(HA)标签连接。

[0092] 本发明的一些实施方案涉及与SEQ ID NO:2同源的蛋白质。一些实施方案涉及与如SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列具有95%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与如SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列具有96%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与如SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列具有97%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与如SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列具有98%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与如SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列具有99%同源性的免疫原性蛋白质。

[0093] 一些实施方案涉及与SEQ ID NO:2相同的蛋白质。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列80%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列85%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列90%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列91%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫

原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列92%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列93%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列94%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列95%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列96%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列97%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列98%相同的氨基酸序列。一些实施方案涉及免疫原性蛋白质,其具有与如SEQ ID NO:2中所列出的全长氨基酸序列99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,蛋白质不含前导序列。在一些实施方案中,蛋白质不含IgE前导序列。

[0094] 蛋白质的片段可包含至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的蛋白质。可提供SEQ ID NO:2的免疫原性片段。免疫原性片段可包含至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,片段包括前导序列,例如像免疫球蛋白前导物,诸如IgE前导物。在一些实施方案中,片段不含前导序列。在一些实施方案中,片段不含前导序列,例如像IgE前导序列。

[0095] 可提供具有与SEQ ID NO:2的免疫原性片段同源的氨基酸序列的蛋白质的免疫原性片段。此类免疫原性片段可包含至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的与SEQ ID NO:2具有95%或更大同源性的蛋白质。一些实施方案涉及与本文蛋白质序列的免疫原性片段具有96%同源性的免疫原性片段。一些实施方案涉及与本文蛋白质序列的免疫原性片段具有97%同源性的免疫原性片段。一些实施方案涉及与本文蛋白质序列的免疫原性片段具有98%同源性的免疫原性片段。一些实施方案涉及与本文蛋白质序列的免疫原性片段具有99%同源性的免疫原性片段。在一些实施方案中,片段包括前导序列,例如像免疫球蛋白前导物,诸如IgE前导物。在一些实施方案中,片段不含前导序列。在一些实施方案中,片段不含前导序列,例如像IgE前导物。

[0096] 可提供具有与SEQ ID NO:2的免疫原性片段相同的氨基酸序列的蛋白质的免疫原性片段。此类免疫原性片段可包含与SEQ ID NO:2中所列出的氨基酸序列80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的蛋白质的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在一些实施方案中,片段包括前导序列,例如像免疫球蛋白前导物,诸如IgE前导物。在一些实施方案中,片段不含前导序列。在一些实施方案中,片段不含前导序列,例如像IgE前导物。

[0097] 如本文关于使信号肽或前导序列连接于蛋白质的N末端所提及,所述信号肽/前导序列替换蛋白质的N末端甲硫氨酸,所述N末端甲硫氨酸由编码所述蛋白质的无信号肽编码序列的核酸序列的起始密码子编码。

[0098] SEQ ID NO:1的片段可包含30个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含45个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含60个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含75个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含90个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含120个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含150个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含180个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含210个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含240个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含270个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含300个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含360个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含420个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含480个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含540个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含600个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含660个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含720个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含780个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含840个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含900个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含960个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含1020个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含1080个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含1140个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含1200个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含1260个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含1320个或更多个核苷酸,优

包含3240个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含3300个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含3360个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含3420个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含3480个或更多个核苷酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的片段不包含IgE前导序列的编码序列。

[0099] 片段可包含少于30个核苷酸,在一些实施方案中少于40个核苷酸,在一些实施方案中少于50个核苷酸,在一些实施方案中少于60个核苷酸,在一些实施方案中少于75个核苷酸,在一些实施方案中少于90个核苷酸,在一些实施方案中少于120个核苷酸,在一些实施方案中少于150个核苷酸,在一些实施方案中少于180个核苷酸,在一些实施方案中少于210个核苷酸,在一些实施方案中少于240个核苷酸,在一些实施方案中少于270个核苷酸,在一些实施方案中少于300个核苷酸,在一些实施方案中少于360个核苷酸,在一些实施方案中少于420个核苷酸,在一些实施方案中少于480个核苷酸,在一些实施方案中少于540个核苷酸,在一些实施方案中少于600个核苷酸,在一些实施方案中少于660个核苷酸,在一些实施方案中少于720个核苷酸,在一些实施方案中少于780个核苷酸,在一些实施方案中少于840个核苷酸,在一些实施方案中少于900个核苷酸,在一些实施方案中少于960个核苷酸,在一些实施方案中少于1020个核苷酸,在一些实施方案中少于1080个核苷酸,在一些实施方案中少于1140个核苷酸,在一些实施方案中少于1200个核苷酸,在一些实施方案中少于1260个核苷酸,在一些实施方案中少于1320个核苷酸,在一些实施方案中少于1380个核苷酸,在一些实施方案中少于1440个核苷酸,在一些实施方案中少于1500个核苷酸,在一些实施方案中少于1560个核苷酸,在一些实施方案中少于1620个核苷酸,在一些实施方案中少于1680个核苷酸,在一些实施方案中少于1740个核苷酸,在一些实施方案中少于1800个核苷酸,在一些实施方案中少于1860个核苷酸,在一些实施方案中少于1920个核苷酸,在一些实施方案中少于1980个核苷酸,在一些实施方案中少于2040个核苷酸,在一些实施方案中少于2100个核苷酸,在一些实施方案中少于2160个核苷酸,在一些实施方案中少于2220个核苷酸,在一些实施方案中少于2280个核苷酸,在一些实施方案中少于2340个核苷酸,在一些实施方案中少于2400个核苷酸,在一些实施方案中少于2460个核苷酸,在一些实施方案中少于2520个核苷酸,在一些实施方案中少于2580个核苷酸,在一些实施方案中少于2640个核苷酸,在一些实施方案中少于2700个核苷酸,在一些实施方案中少于2760个核苷酸,在一些实施方案中少于2820个核苷酸,在一些实施方案中少于2860个核苷酸,在一些实施方案中少于2940个核苷酸,在一些实施方案中少于3000个核苷酸,在一些实施方案中少于3060个核苷酸,在一些实施方案中少于3120个核苷酸,在一些实施方案中少于3180个核苷酸,在一些实施方案中少于3240个核苷酸,在一些实施方案中少于3300个核苷酸,在一些实施方案中少于3360个核苷酸,在一些实施方案中少于3420个核苷酸,在一些实施方案中少于3480个核苷酸,以及在一些实施方案中少于3510个核苷酸。

[0100] SEQ ID NO:2的片段可包含10个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含15个或更多个氨基酸,优选地包括

免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含750个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含780个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含810个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含840个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含870个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含900个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含930个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含960个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含990个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含1020个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含1050个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含1080个或更多个氨基酸,优选地包括编码免疫显性表位的序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段可包含IgE前导序列的编码序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的片段不包含IgE前导序列的编码序列。

[0101] 片段可包含少于15个氨基酸,在一些实施方案中少于20个氨基酸,在一些实施方案中少于24个氨基酸,在一些实施方案中少于30个氨基酸,在一些实施方案中少于36个氨基酸,在一些实施方案中少于42个氨基酸,在一些实施方案中少于48个氨基酸,在一些实施方案中少于54个氨基酸,在一些实施方案中少于60个氨基酸,在一些实施方案中少于72个氨基酸,在一些实施方案中少于90个氨基酸,在一些实施方案中少于120个氨基酸,在一些实施方案中少于150个氨基酸,在一些实施方案中少于180个氨基酸,在一些实施方案中少于210个氨基酸,在一些实施方案中少于240个氨基酸,在一些实施方案中少于260个氨基酸,在一些实施方案中少于290个氨基酸,在一些实施方案中少于320个氨基酸,在一些实施方案中少于350个氨基酸,在一些实施方案中少于380个氨基酸,在一些实施方案中少于410个氨基酸,在一些实施方案中少于440个氨基酸,在一些实施方案中少于470个氨基酸,在一些实施方案中少于500个氨基酸,在一些实施方案中少于530个氨基酸,在一些实施方案中少于560个氨基酸,在一些实施方案中少于590个氨基酸,在一些实施方案中少于620个氨基酸,在一些实施方案中少于650个氨基酸,在一些实施方案中少于680个氨基酸,在一些实施方案中少于710个氨基酸,在一些实施方案中少于740个氨基酸,在一些实施方案中少于770个氨基酸,在一些实施方案中少于800个氨基酸,在一些实施方案中少于830个氨基酸,在一些实施方案中少于860个氨基酸,在一些实施方案中少于890个氨基酸,在一些实施方案中少于920个氨基酸,在一些实施方案中少于950个氨基酸,在一些实施方案中少于980个氨基酸,在一些实施方案中少于1010个氨基酸,在一些实施方案中少于1040个氨基酸,在一些实施方案中少于1070个氨基酸,在一些实施方案中少于1200个氨基酸,在一些实施方案中少于1230个氨基酸,在一些实施方案中少于1260个氨基酸,在一些实施方案中少于1290个氨基酸,在一些实施方案中少于1320个氨基酸,在一些实施方案中少于1350个氨基酸,在一些实施方案中少于1380个氨基酸,在一些实施方案中少于1410个氨基酸,在一些实施方案中

少于1440个氨基酸,在一些实施方案中少于1470个氨基酸,以及在一些实施方案中少于1500个氨基酸。

[0102] b. 另外的癌抗原

[0103] 本发明的疫苗可包含或编码除上述dTERT抗原之外的一种或多种癌抗原。就这一点而言,一种或多种另外的癌抗原可以是核酸序列、氨基酸序列或其组合。核酸序列可以是DNA、RNA、cDNA、其变体、其片段或其组合。核酸序列还可包括编码通过肽键连接至癌抗原的接头序列或标签序列的另外序列。氨基酸序列可以是蛋白质、肽、其变体、其片段或其组合。一种或多种另外的癌抗原可以是重组癌抗原。

[0104] 3. 疫苗与免疫检查点抑制剂结合

[0105] 免疫检查点分子的抑制剂可以是核酸序列、氨基酸序列、小分子或其组合。核酸序列可以是DNA、RNA、cDNA、其变体、其片段或其组合。核酸还可包括编码通过肽键连接至免疫检查点抑制剂的接头序列或标签序列的另外序列。小分子可以是低分子量,例如小于800道尔顿,可用作酶底物的有机或无机化合物,由蛋白质或核酸结合的配体(或其类似物)或生物过程的调节剂。氨基酸序列可以是蛋白质、肽、其变体、其片段或其组合。

[0106] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂可以是编码抗体、其变体、其片段或其组合的一种或多种核酸序列。在其他实施方案中,免疫检查点抑制剂可以是抗体、其变体、其片段或其组合。

[0107] 4. 疫苗构建体和质粒

[0108] 本发明的疫苗可包含编码上述抗原和/或抗体的核酸构建体或质粒。核酸构建体或质粒可包括或含有一种或多种异源核酸序列。本文提供了遗传构建体,其可包含编码上述抗原和/或抗体的核酸序列。遗传构建体可作为功能性染色体外分子存在于细胞中。遗传构建体可以是包括着丝粒、端粒或质粒或粘粒的线性微型染色体。遗传构建体可包括或含有一种或多种异源核酸序列。

[0109] 遗传构建体可以是以任何顺序表达上述抗原和/或抗体的质粒形式。

[0110] 遗传构建体还可以是重组病毒载体的基因组的一部分,所述重组病毒载体包括重组腺病毒、重组腺病毒伴随病毒(AAV)以及重组牛痘病毒。遗传构建体可以是在减毒的活微生物或活在细胞中的重组微生物载体中的遗传物质的部分。

[0111] 遗传构建体可包含用于核酸的编码序列的基因表达的调控元件。调控元件可以是启动子、增强子、起始密码子、终止密码子或聚腺苷酸化信号。

[0112] 核酸序列可构成可以是载体的遗传构建体。载体能够在哺乳动物中有效引发免疫响应的量在哺乳动物的细胞中表达上述抗原和/或抗体。载体可以是重组的。载体可包含一种或多种编码上述抗原和/或抗体的异源核酸分子。载体可以是质粒。载体可用于用一种或多种编码上述抗原和/或抗体的核酸分子转染宿主细胞,其中转染的宿主细胞在表达上述抗原和/或抗体的条件下培养和维持。

[0113] 编码序列可被优化用于表达的稳定性 and 高水平。在一些情况下,选择密码子以减少RNA中二级结构的形成,诸如由于分子内键而形成的二级结构。

[0114] 载体可包含一种或多种编码上述抗原和/或抗体的异源核酸分子,并且还可包含起始密码子,其可在一种或多种癌抗原编码序列的上游,和终止密码子,其可以是上述抗原和/或抗体的编码序列的下游。起始和终止密码子可与上述抗原和/或抗体的编码序列同

框。载体还可包含可操作地连接至上述抗原和/或抗体的编码序列的启动子。可操作地连接至上述抗原和/或抗体的编码序列的启动子可以是任何合适的蛋白质,包括但不限于来自猿猴病毒40(SV40)的启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子诸如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复(LTR)启动子、莫洛尼(Moloney)病毒启动子、禽类白血病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子诸如CMV立即早期启动子、EB病毒(EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子。启动子还可以是来自哺乳动物启动子的启动子,例如像肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子、肌肉肌酸启动子或金属硫蛋白启动子。启动子还可以是组织特异性启动子,诸如天然或合成的肌肉或皮肤特异性启动子(参见例如,美国专利申请公布US2004/0175727)。

[0115] 载体还可包含聚腺苷酸化信号,其可在上述抗原和/或抗体的编码序列的下游。聚腺苷酸化信号可以是任何合适的聚腺苷酸化信号,包括例如,SV40聚腺苷酸化信号、LTR聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化信号、人生长激素(hGH)聚腺苷酸化信号或人 β -球蛋白聚腺苷酸化信号。SV40聚腺苷酸化信号可以是来自pCEP4载体(Invitrogen, San Diego, CA)的聚腺苷酸化信号。

[0116] 载体还可包含上述抗原和/或抗体上游的增强子。增强子可能是DNA表达所必须的。增强子可从任何合适的哺乳动物基因中分离或衍生,例如像肌动蛋白、肌球蛋白、血红蛋白、肌肉肌酸或病毒,例如像CMV、HA、RSV或EBV。多核苷酸功能增强子描述于例如,美国专利5,593,972和5,962,428,以及国际专利申请公布WO 94/016737中。

[0117] 载体还可包含哺乳动物的复制起点,以便将载体维持在染色体外并在细胞中产生载体的多个拷贝。载体可以是来自Invitrogen(San Diego, CA)的pVAX1、pCEP4或pREP4,其可包含EB病毒的复制起点和核抗原EBNA-1编码区域,这可在没有整合的情况下产生高拷贝附加型复制。载体可以是pVAX1或其变体。例如,pVAX1变体质粒pGX0001是主链载体质粒pVAX1(Invitrogen, Carlsbad CA)的2998碱基对变体。pGX0001质粒包含以下元件:(a)位于碱基137-724处的CMV启动子,(b)位于碱基664-683处的T7启动子/引发位点,(c)位于碱基696-811处的多个克隆位点,(d)位于碱基829-1053处的牛GH聚腺苷酸化信号,(e)位于碱基1226-2020处的卡那霉素抗性(Kan^R)基因,和(f)位于碱基2320-2993处的pUC起点。

[0118] 基于可从Invitrogen获得的pVAX1的序列,可对pVAX1进行另外的突变以便产生本发明的疫苗。在一个实施方案中,可在pVAX1的核酸序列中进行以下突变:

[0119] C>G241在CMV启动子中

[0120] C>T 1158主链,在牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH polyA)的下游

[0121] A>-2092主链,在卡那霉素抗性基因(Kan^R)的下游

[0122] C>T 2493在pUC复制起点(pUC ori)中

[0123] G>C 2969在RNA酶H位点上游的pUC Ori的最末端中,和

[0124] 在CMV启动子上游的主链上碱基对2、3和4可从ACT变为CTG。

[0125] 所述载体还可包含调控序列,所述调控序列可非常适合在施用所述载体的哺乳动物(例如,犬)细胞中的基因表达。本文公开的一种或多种癌抗原序列可包含一个或多个密码子,其允许在特定宿主细胞中更有效地转录编码序列。

[0126] 载体可以是pSE420(Invitrogen, San Diego, Calif.),其可用于在大肠杆菌(E. coli)中产生蛋白质。载体还可以是pYES2(Invitrogen, San Diego, Calif.),其可用于

在酵母的酿酒酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae* strain) 中产生蛋白质。载体还可具有MAXBAC™完整的杆状病毒表达系统 (Invitrogen, San Diego, Calif.), 其可用于在昆虫细胞中产生蛋白质。载体还可以是pcDNA 1或者pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), 其可用于在哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中产生蛋白质。载体可使用常规技术和容易获得的起始材料产生, 诸如在例如Sambrook等, *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989) 中所述的那些。

[0127] 在一个实施方案中, 本发明的疫苗是质粒载体, 其包含SEQ ID NO:3的多核苷酸序列。

[0128] 5. 疫苗的药物组合物

[0129] 疫苗可以是药物组合物的形式, 即, 包含疫苗和药学上可接受的载体的组合物。药物组合物可包含疫苗。药物组合物可包含约5纳克至约10mg的疫苗DNA。在一些实施方案中, 根据本发明的药物组合物包含约25纳克至约5mg的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约50纳克至约1mg的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约0.1至约1,500微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约1至约800微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约5至约500微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约10至约250微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约15至约150微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约20至约100微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约25至约75微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约30至约50微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约35至约40微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物含有约100至约200微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物包含约10微克至约100微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物包含约20微克至约80微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物包含约25微克至约60微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物包含约30纳克至约50微克的疫苗DNA。在一些实施方案中, 药物组合物包含约35纳克至约45微克的疫苗DNA。在一些优选的实施方案中, 药物组合物含有约0.1至约800微克的疫苗DNA。在一些优选的实施方案中, 药物组合物含有约1至约500微克的疫苗DNA。在一些优选的实施方案中, 药物组合物含有约25至约300微克的疫苗DNA。在一些优选的实施方案中, 药物组合物含有约100至约200微克的疫苗DNA。

[0130] 在一些实施方案中, 根据本发明的药物组合物包含至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895、900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、1000、1005、1010、1015、1020、1025、1030、1035、1040、1045、1050、1055、1060、1065、1070、1075、1080、1085、1090、1095、1100、1105、1110、1115、1120、1125、1130、1135、1140、1145、1150、

1155、1160、1165、1170、1175、1180、1185、1190、1195、1200、1205、1210、1215、1220、1225、1230、1235、1240、1245、1250、1255、1260、1265、1270、1275、1280、1285、1290、1295、1300、1305、1310、1315、1320、1325、1330、1335、1340、1345、1350、1355、1360、1365、1370、1375、1380、1385、1390、1395、1400、1405、1410、1415、1420、1425、1430、1435、1440、1445、1450、1455、1460、1465、1470、1475、1480、1485、1490、1495、1500、1505、1510、1515、1520、1525、1530、1535、1540、1545、1550、1555、1560、1565、1570、1575、1580、1585、1590、1595、1600、1605、1610、1615、1620、1625、1630、1635、1640、1645、1650、1655、1660、1665、1670、1675、1680、1685、1690、1695、1700、1705、1710、1715、1720、1725、1730、1735、1740、1745、1750、1755、1760、1765、1770、1775、1780、1785、1790、1795或1800微克的疫苗DNA。

[0131] 在其他实施方案中,药物组合物可包含至多且包括1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895、900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、1000、1005、1010、1015、1020、1025、1030、1035、1040、1045、1050、1055、1060、1065、1070、1075、1080、1085、1090、1095、1100、1105、1110、1115、1120、1125、1130、1135、1140、1145、1150、1155、1160、1165、1170、1175、1180、1185、1190、1195、1200、1205、1210、1215、1220、1225、1230、1235、1240、1245、1250、1255、1260、1265、1270、1275、1280、1285、1290、1295、1300、1305、1310、1315、1320、1325、1330、1335、1340、1345、1350、1355、1360、1365、1370、1375、1380、1385、1390、1395、1400、1405、1410、1415、1420、1425、1430、1435、1440、1445、1450、1455、1460、1465、1470、1475、1480、1485、1490、1495、1500、1505、1510、1515、1520、1525、1530、1535、1540、1545、1550、1555、1560、1565、1570、1575、1580、1585、1590、1595、1600、1605、1610、1615、1620、1625、1630、1635、1640、1645、1650、1655、1660、1665、1670、1675、1680、1685、1690、1695、1700、1705、1710、1715、1720、1725、1730、1735、1740、1745、1750、1755、1760、1765、1770、1775、1780、1785、1790、1795或1800微克的疫苗DNA。

[0132] 根据待使用的施用模式,药物组合物可出于配制目的还包含其他试剂。在药物组合物是可注射的药物组合物的情况下,它们是无菌、无热原以及无颗粒的。优选使用等渗制剂。通常,等渗的添加剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇和乳糖。在一些情况下,等渗溶液诸如磷酸盐缓冲盐水是优选的。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实施方案中,将血管收缩剂添加到制剂中。

[0133] 疫苗或药物组合物还可包含药学上可接受的载体或赋形剂。药学上可接受的载体或赋形剂可以是作为媒介物、佐剂、载体或稀释剂的功能分子。药学上可接受的载体或赋形剂可以是转染促进剂,其可包括表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCMS)、费氏(Freunds)不完全佐剂、LPS类似物(包括单磷酸酯A)、胞壁肽、苯醌类似物、囊泡诸如角鲨烯

和角鲨烯、透明质酸、脂质、脂质体、钙离子、病毒蛋白质、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒或其他已知的转染促进剂。

[0134] 转染促进剂可以是聚阴离子、聚阳离子(包括聚-L-谷氨酸盐(LGS))或脂质。转染促进剂可以是聚-L-谷氨酸盐,并且更优选地,聚-L-谷氨酸盐可以小于6mg/ml的浓度存在于疫苗中。转染促进剂还可包括表面活性剂,诸如免疫刺激复合物(ISCMS)、弗氏不完全佐剂、LPS类似物(包括单磷酸脂质A)、胞壁酰肽、醌类似物以及囊泡(如角鲨烯和角鲨烯)和透明质酸。在一些实施方案中,疫苗组合物还可包括一种或多种转染促进剂,例如像脂质、脂质体(例如,卵磷脂脂质体或本领域已知的其他脂质体)如DNA-脂质体混合物(参见例如,国际专利申请公布WO 93/24640)、钙离子、病毒蛋白质、聚阴离子、聚阳离子或纳米颗粒或其他已知的转染促进剂。优选地,转染促进剂可以是聚阴离子、聚阳离子(包括聚-L-谷氨酸盐(LGS))或脂质。转染剂在所述疫苗中的浓度为小于4mg/ml、小于2mg/ml、小于1mg/ml、小于0.750mg/ml、小于0.500mg/ml、小于0.250mg/ml、小于0.100mg/ml、小于0.050mg/ml或小于0.010mg/ml。

[0135] 药学上可接受的载体或赋形剂可以是佐剂。佐剂可以是在替代的质粒中表达或作为蛋白质与在疫苗中的以上质粒组合而被递送的其他基因。佐剂可选自由以下组成的组: α -干扰素(IFN- α)、 β -干扰素(IFN- β)、 γ -干扰素、血小板衍生的生长因子(PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、皮肤的T细胞吸引趋化因子(CTACK)、上皮胸腺表达趋化因子(TECK)、粘膜有关的上皮趋化因子(MEC)、IL-12、IL-15、MHC、CD80、CD86(包括缺失信号序列并任选包括来自IgE的信号肽的IL-15)。佐剂可以是IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、血小板衍生的生长因子(PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18或其组合。在示例性实施方案中,佐剂是IL-12。

[0136] 可以是可用的佐剂的其他基因包括编码以下的那些基因:MCP-1、MIP-1a、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I κ B、失活NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素响应基因、NF κ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配体、Ox40、Ox40配体、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2以及其功能片段。

[0137] 6. 用于治疗特定癌症的疫苗

[0138] 本发明的疫苗可包含编码作为治疗哺乳动物中特定癌症或肿瘤的唯一癌抗原的dTERT抗原的多核苷酸序列。可替代地,本发明的疫苗可包含一种或多种另外的多核苷酸序列,其编码一种或多种另外的癌抗原以治疗哺乳动物(例如,犬)中的特定癌症或肿瘤。在另一个实施方案中,包含编码dTERT抗原的多核苷酸的本发明疫苗可与一种或多种单独的疫苗组合施用至哺乳动物,所述一种或多种单独的疫苗各自编码或包含一种或多种另外的癌抗原(诸如本文所述的那些),以治疗哺乳动物中的特定癌症或肿瘤。

[0139] 取决于本发明的治疗癌症或肿瘤的方法是单独靶向TERT抗原,还是TERT抗原与一种或多种另外癌抗原组合,可用疫苗靶向各种癌症或其他肿瘤类型。此类癌症包括例如,可

包括黑素瘤、前列腺癌、肝癌、宫颈癌、复发性呼吸道乳头状瘤病 (RRP)、肛门癌、头颈癌、血癌 (例如, 白血病、淋巴瘤、骨髓瘤)、肺癌 (例如, 非小细胞肺癌)、食道鳞状细胞癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、肝癌、脑癌 (例如, 胶质母细胞瘤)、胰腺癌、滑膜癌、睾丸癌和胃癌。

[0140] 7. 疫苗接种方法

[0141] 本文提供了一种用于治疗或预防癌症的方法, 其包括向有需要的哺乳动物施用本发明的疫苗, 优选地作为药学上可接受的组合物的一部分。施用所述疫苗或疫苗接种的方法可被提供来诱导治疗性和/或预防性免疫响应。疫苗接种过程可在哺乳动物中产生针对如本文所公开的癌抗原中的一种或多种的免疫响应。疫苗可施用至个体以调节哺乳动物免疫系统的活性并增强免疫响应。疫苗的施用可以是作为核酸分子的如本文所公开的一种或多种癌抗原的转染, 所述核酸分子在细胞中表达并因此被递送至细胞的表面, 在细胞表面上免疫系统识别并诱导细胞响应、体液响应或细胞和体液响应。通过向哺乳动物施用如本文所讨论的疫苗, 疫苗的施用可用于在哺乳动物中诱导或引发针对癌抗原中的一种或多种的免疫响应。

[0142] 在将疫苗施用至哺乳动物并且随后载体进入哺乳动物的细胞中后, 转染的细胞将表达并分泌如本文所公开的癌抗原中的一种或多种。这些分泌的蛋白质或合成抗原将作为外来物质而被免疫系统识别, 这将进行可包括以下的免疫响应: 生成针对一种或多种癌抗原的抗体, 和/或特异性针对一种或多种癌抗原的T细胞响应。在一些实例中, 用本文所讨论的疫苗接种的哺乳动物将具有引发的免疫系统, 并且在被如本文所公开的一种或多种癌抗原激发时, 引发的免疫系统将允许通过体液免疫响应、细胞免疫响应或细胞和体液免疫响应两者快速清除随后的如本文所公开的癌抗原。疫苗可施用至个体以调节个体免疫系统的活性, 从而增强免疫响应。

[0143] 施用DNA疫苗的方法描述于例如, 美国专利4,945,050和5,036,006中。

[0144] 疫苗可施用至哺乳动物以在哺乳动物中引发免疫响应。哺乳动物可以是犬 (狗)、人、非人灵长类动物、牛、猪、羊、山羊、羚羊、野牛、水牛、牛、鹿、刺猬、大象、骆驼、羊驼、小鼠、大鼠或鸡。优选地, 哺乳动物是犬、人、牛、猪或鸡。

[0145] 疫苗剂量可以在 $1\mu\text{g}$ 与 10mg 之间的活性组分/kg体重/时间, 并且可以是 $20\mu\text{g}$ 至 10mg 组分/kg体重/时间。可每1、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或31天施用疫苗。用于有效治疗的疫苗剂量的数目可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多剂量。

[0146] a. 用疫苗产生免疫响应的方法

[0147] 疫苗可用于在哺乳动物中产生免疫响应, 包括治疗性或预防性免疫响应。免疫响应可产生针对如本文所公开的一种或多种癌抗原的抗体和/或杀伤性T细胞。可分离此类抗体和T细胞。在一个实施方案中, 本发明提供了一种在哺乳动物中诱导针对端粒酶逆转录酶 (TERT) (例如, hTERT或dTERT) 的免疫响应的方法, 所述方法包括向有需要的哺乳动物施用本文所述的疫苗, 由此核酸分子在哺乳动物中表达并且诱导以下免疫响应中的一种或多种: (a) 对TERT特异的体液免疫响应, (b) 炎性响应, 包含与未施用疫苗的哺乳动物相比, 增加的肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 水平, 和 (c) 对TERT特异的细胞免疫响应。

[0148] 一些实施方案提供了产生针对如本文所公开的癌抗原中的一种或多种的免疫响

应的方法,其包括向有需要的哺乳动物施用所述疫苗。一些实施方案提供了针对表达如上所述的癌抗原中的一种或多种的癌症或肿瘤预防性地接种哺乳动物的方法,其包括向有需要的哺乳动物施用所述疫苗。一些实施方案提供了治疗性地接种已患有表达所述癌抗原中的一种或多种的癌症或肿瘤的哺乳动物的方法,其包括向有需要的哺乳动物施用所述疫苗。可使用常规诊断方法在施用疫苗之前诊断表达如本文所公开的癌抗原中的一种或多种的癌症或肿瘤。

[0149] b. 用疫苗治疗癌症的方法

[0150] 疫苗可用于在哺乳动物中产生或引发免疫响应,所述免疫响应对哺乳动物或有需要的受试者中的癌症或肿瘤(例如,黑色素瘤、头颈癌、宫颈癌、肝癌、前列腺癌、血癌、食道鳞状细胞癌、胃癌等)具有反应性或针对性。引发的免疫响应可预防癌症或肿瘤生长。

[0151] 引发的免疫响应可预防和/或减少癌细胞或肿瘤细胞的转移。因此,所述疫苗可在一种治疗和/或预防哺乳动物或施用疫苗的受试者中的癌症或肿瘤的方法中使用。取决于疫苗中使用的抗原,治疗的癌症或肿瘤可以是本领域已知的和本文所述的任何类型的癌症,诸如但不限于黑色素瘤、血癌(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、食道鳞状细胞癌、膀胱癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、肝癌、头颈癌、脑癌(例如,胶质母细胞瘤)、肛门癌、胰腺癌、滑膜癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、宫颈癌、复发性呼吸道乳头状瘤病(RRP)、皮肤癌和胃癌。

[0152] 在一些实施方案中,施用的疫苗可通过以下来介导清除或防止肿瘤细胞的生长:

(1) 通过B细胞响应诱导体液免疫,以产生阻断单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)产生的抗体,从而延迟髓源性抑制细胞(MDSC)并抑制肿瘤生长;(2) 增加细胞毒性T淋巴细胞,诸如CD8⁺(CTL),以攻击并杀死肿瘤细胞;(3) 增加T辅助细胞响应;(4) 与未治疗哺乳动物相比,通过IFN- γ 和TFN- α 增加炎性响应,或优选所有上述响应。

[0153] 在一些实施方案中,免疫响应可产生体液免疫响应和/或抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)响应,其不会在施用疫苗的受试者中引起各种组织或系统(例如,脑或神经系统)的损伤或炎症。

[0154] 在一些实施方案中,在受试者中,施用的疫苗可提高无肿瘤存活率、减少肿瘤肿块、提高肿瘤存活率或其组合。在受试者中,施用的疫苗可使无肿瘤存活率提高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%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%和60%。在免疫后的受试者中,施用的疫苗可使肿瘤肿块减少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%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%和70%。在受试者中,施用的疫苗可预防和阻断单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)的增加,其是由髓源性抑制细胞分泌的细胞因子。在一些实施方案中,施用的疫苗可预防和阻断受试者中的癌或肿瘤组织内MCP-1的增加,从而减少受试者中癌或肿瘤组织的血管形成。

[0155] 在受试者中,施用的疫苗可使肿瘤存活率提高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%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%和70%。在一些实施方案中,疫苗可施用至外周(如下文更详细描述)以建立靶向癌或肿瘤细胞或组织的抗原特异性免疫反应,从而在施用疫苗的受试者中清除或消除表达一种或多种癌抗原的癌症或肿瘤,而不损伤或导致疾病或死亡。

[0156] 施用的疫苗可使受试者中的细胞免疫反应增加约50倍至约6000倍、约50倍至约5500倍、约50倍至约5000倍、约50倍至约4500倍、约100倍至约6000倍、约150倍至约6000倍、约200倍至约6000倍、约250倍至约6000倍或约300倍至约6000倍。在一些实施方案中,施用的疫苗可使受试者中的细胞免疫反应增加约50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、1600倍、1700倍、1800倍、1900倍、2000倍、2100倍、2200倍、2300倍、2400倍、2500倍、2600倍、2700倍、2800倍、2900倍、3000倍、3100倍、3200倍、3300倍、3400倍、3500倍、3600倍、3700倍、3800倍、3900倍、4000倍、4100倍、4200倍、4300倍、4400倍、4500倍、4600倍、4700倍、4800倍、4900倍、5000倍、5100倍、5200倍、5300倍、5400倍、5500倍、5600倍、5700倍、5800倍、5900倍或6000倍。

[0157] 与未用本发明疫苗治疗的受试者相比,施用的疫苗可使受试者中的干扰素 γ (IFN- γ)水平增加约50倍至约6000倍、约50倍至约5500倍、约50倍至约5000倍、约50倍至约4500倍、约100倍至约6000倍、约150倍至约6000倍、约200倍至约6000倍、约250倍至约6000倍或约300倍至约6000倍。在一些实施方案中,与未用本发明疫苗治疗的受试者相比,施用的疫苗可使受试者中的IFN- γ 水平增加约50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、650倍、700倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1000倍、1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、1600倍、1700倍、1800倍、1900倍、2000倍、2100倍、2200倍、2300倍、2400倍、2500倍、2600倍、2700倍、2800倍、2900倍、3000倍、3100倍、3200倍、3300倍、3400倍、3500倍、3600倍、3700倍、3800倍、3900倍、4000倍、4100倍、4200倍、4300倍、4400倍、4500倍、4600倍、4700倍、4800倍、4900倍、5000倍、5100倍、5200倍、5300倍、5400倍、5500倍、5600倍、5700倍、5800倍、5900倍或6000倍。

[0158] 疫苗剂量可以是在1 μ g与10mg之间的活性组分/kg体重/时间,并且可以是20 μ g至10mg组分/kg体重/时间。可每1、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或31天施用疫苗。用于有效治疗的疫苗剂量的数目可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0159] 8. 施用途径

[0160] 疫苗或药物组合物可通过不同途径施用,包括例如口服、肠胃外、舌下、透皮、直肠、经粘膜、局部、吸入、颊面施用、胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、鼻囊内、关节内或其组合。对于兽医用途,所述组合物可根据标准的兽医规范作为适当可接受制剂来施用。兽医可容易地确定最适合特定动物的给药方案和施用途径。疫苗可通过传统的注射器、无针注射设备、“微粒轰击枪”或其他物理方法诸如电穿孔(“EP”)、“流体动力学方法”或超声波来施用。

[0161] 疫苗可通过若干熟知的技术施用至哺乳动物,所述技术包括在有和没有体内电穿孔、脂质体介导的纳米颗粒促进的重组载体情况下的DNA注射(也称为DNA疫苗接种),所述

重组载体诸如重组腺病毒、重组AAV以及重组牛痘病毒。疫苗的一种或多种癌抗原可通过DNA注射和/或体内电穿孔来施用。

[0162] a. 电穿孔

[0163] 疫苗或药物组合物可通过电穿孔来施用。通过电穿孔施用所述疫苗可使用电穿孔设备来完成,所述电穿孔设备被配置来对所需的哺乳动物组织递送在细胞膜中有效形成可逆的细孔的脉冲能量,并且优选地所述脉冲能量是与使用者输入的预先设定的电流相似的恒定电流。所述电穿孔设备可包括电穿孔部件和电极组件或手柄组件。电穿孔部件可包括且并入电穿孔设备的各种元件中的一种或多种,其包括:控制器、电流波形发生器、阻抗测定、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端口、存储部件、电源以及电源开关。电穿孔可使用体内电穿孔设备,例如CELLECTRA®EP系统(Inovio Pharmaceuticals公司, Plymouth Meeting, PA)或Elgen电穿孔仪(Inovio Pharmaceuticals公司)来促进质粒转染细胞而完成。

[0164] 可促进施用本发明的DNA疫苗的电穿孔设备和电穿孔方法的实例包括在例如美国专利7,245,963和美国专利公布号2005/0052630中描述的那些。可用于促进施用DNA疫苗的其他电穿孔设备和电穿孔方法包括在例如美国专利申请公布号2008/0091135中描述的那些。

[0165] 美国专利7,245,963描述了模块化电极系统及其用于促进生物分子引入到身体或植物中所选定的组织的细胞中的用途。所述模块化电极系统可包括多个针电极;皮下注射针;提供从可编程的恒定电流脉冲控制器到多个针电极的传导性连接的电连接器;以及电源。操作者可抓住固定在支撑结构上的多个针电极并将它们坚固地插入到身体或植物中所选定的组织中。然后通过皮下注射针将生物分子施用到所选定的组织中。启动可编程的恒定电流脉冲控制器,并将恒定电流电脉冲施加到多个针电极中。所施加的恒定电流电脉冲促进将生物分子引入到多个电极之间的细胞中。

[0166] 美国专利申请公布号2005/0052630描述了可用于有效促进生物分子引入到身体或植物中所选定的细胞中的电穿孔设备。电穿孔设备包括其操作由软件或固件来规定的电动力学设备(“EKD设备”)。EKD设备基于用户控制和脉冲参数输入在阵列中的电极之间产生一系列可编程恒定电流脉冲图案,并允许存储和获取电流波形数据。电穿孔设备还包括具有一排针电极的可替换的电极圆盘、用于注射针的中央注射通道以及可移动的导向盘。

[0167] 在美国专利7,245,963和美国专利申请公布号2005/0052630中描述的电极阵列和方法可被适配用于不仅深入穿透到组织诸如肌肉中,而且深入穿透到其他组织或器官中。由于电极阵列的配置,注射针也被完全插入到靶器官中,并且注射是在由这些电极预先描绘的区域内垂直地施用至的靶组织上。在美国专利7,245,963和美国专利申请公布号2005/005263中描述的电极优选地是20mm长以及21号规格。

[0168] 另外,在一些实施方案中,电穿孔设备可以是描述于例如,美国专利5,273,525;6,110,161;6,261,281;6,958,060;和6,939,862中的设备。此外,美国专利6,697,669中描述的方法涉及使用任何各种设备施用DNA,并且美国专利7,328,064涉及注射DNA的方法也可用于本发明的上下文中。

[0169] 9. 制备疫苗的方法

[0170] 本文提供了用于制备包含本文所讨论的疫苗的DNA质粒的方法。所述DNA质粒在最

终亚克隆步骤进入哺乳动物表达质粒之后,可用于在大型发酵罐中使用本领域已知的方法接种细胞培养物。

[0171] 用于与本发明的EP设备一起使用的DNA质粒可使用已知设备和技术的组合来配制或制造,但优选地它们使用优化质粒制造技术来制造,所述技术描述于例如,美国专利申请公布2009/0004716中。在一些实施方案中,在这些研究中使用的DNA质粒可按大于或等于10mg/mL的浓度来配制。除了描述于美国专利申请公布号2009/0004716和美国专利7,238,522中的设备和方案之外,制造技术还包括或并入了本领域普通技术人员通常已知的各种设备和方案。

[0172] 本发明具有多个方面,所述方面通过以下非限制性实施例说明。

[0173] 10. 实施例

[0174] 实施例1

[0175] 此实施例描述了一种产生质粒疫苗的方法,所述质粒疫苗包含编码dTERT抗原的多核苷酸序列。

[0176] pGX1414是包含SEQ ID NO:3的多核苷酸序列的DNA质粒,其包含可操作地连接至人CMV启动子(hCMV启动子)和牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH polyA)的编码合成共有狗端粒酶逆转录酶(SYNCON dTERT)的SEQ ID NO:1多核苷酸序列。质粒主链包括卡那霉素抗性基因(Kan^R)和质粒复制起点(pUC ori)。pGX1414的遗传元件列于表1中,并且pGX1414的示意图如图1所描绘。

[0177] 表1

元件	碱基对
hCMV启动子	137-724
SynCon dTERT编码序列	742-4164
bGH PolyA	4215-4439
卡那霉素抗性基因(Kan ^R)	4612-5406
pUC Ori	5705-6378

[0179] 通过在BamHI和NotI位点处将合成共有狗端粒酶逆转录酶(SYNCON dTERT)克隆到pGX0001中来产生pGX1414。为了产生共有狗TERT序列,从GenBank收集19条TERT序列,并且在使用Clustal W(DNASTAR)进行序列比对后获得共有序列。在含有很大多样性残基的位置(由软件定义为‘不一致水平1和2’)处,氨基酸的选择朝向天然狗TERT进行加权。

[0180] 用于产生共有狗TERT序列的GenBank登录号如下:NP_001026800、NP_001026800.1、XP_004411686、XP_004768446、XP_004812556、EFB14781、XP_004812554、XP_004768447、XP_004440093、XP_004411687、XP_004812555、XP_004274558、NP_937983、AAC51724、NP_001177896、XP_004380340、NP_001039707、XP_003950543、NP_001231229和DAA17756。

[0181] 一旦获得共有dTERT序列,则掺入两个突变(R579Y和D996Y)以帮助破坏耐受性(参见例如,Gross等,J.Clin.Invest.,113:425-433(2004))。另外,引入了5个突变(K633A、R638A、D719A、Y724A和D876A)以消除端粒酶活性(参见例如,Weinrich等,Nature Genetics,17:498-502(1997))。最终修饰的共有dTERT序列与天然狗TERT氨基酸序列具有95.4%的序列同一性。将上游Kozak序列和IgE前导序列添加至N-末端以增加表达。为了使

表达水平最大化,使共有dTERT序列的密码子使用适应哺乳动物基因的密码子偏倚。还进行了RNA翻译的DNA优化:GC含量非常高(>80%)或非常低(<30%)的区域和顺式作用序列基序诸如内部TATA盒、chi位点和核糖体进入位点被避免。将合成的SYNCON dTERT用BamHI和NotI消化,并且克隆到表达载体pGX0001中。

[0182] 将共有dTERT编码序列(SEQ ID NO:1)克隆到人巨细胞病毒立即早期启动子(hCMV启动子)与bGH polyA之间的pGX0001(修饰的pVAX1表达载体)中。原始pVAX1表达载体可购自Life Technologies(Carlsbad,CA)。修饰的pVAX1(pGX0001)表达载体的图谱显示在图2中。

[0183] 引入pVAX1以产生pGX0001的修饰基于可购自Life Technologies的报道的pVAX1序列。这些修饰在以下列出,并且不妨碍质粒扩增或抗原转录和翻译。迄今为止,在使用pGX0001作为主链的任何质粒产物中未观察到pGX0001序列的进一步变化。

[0184] C>G 241在CMV启动子中

[0185] C>T 1158主链,在牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH polyA)的下游

[0186] A>-2092主链,在卡那霉素抗性基因(KanR)的下游

[0187] C>T 2493在pUC复制起点(pUC ori)中

[0188] G>C 2969在RNaseH位点上游的pUC Ori的最末端中,和

[0189] 在CMV启动子上游的主链上碱基对2、3和4从ACT变为CTG。

[0190] 此实施例的结果证明了本发明疫苗的产生。

[0191] 实施例2

[0192] 此实施例证明了本发明的表达dTERT的疫苗在小鼠中的免疫原性。

[0193] 检查了pGX1414(在实施例1中描述)在C57BL/6小鼠中诱导细胞介导的免疫响应的能力。简而言之,将8周龄雌性C57BL/6小鼠(n=5)分成两组:天然组和用25 μ g pGX1414通过肌肉注射(IM)到股四头肌中随后使用**CELLECTRA®**自适应恒流设备(Inovio Pharmaceuticals Inc.,Plymouth Meeting,PA)进行电穿孔(EP)而免疫的组。所述设备被配置成递送两个具有52ms脉冲宽度、间隔一秒延迟的0.1安培脉冲。小鼠间隔两周接受四次免疫。在最后一次免疫后一周,处死小鼠,回收脾脏,分离脾细胞,并进行小鼠IFN- γ ELISpot测定以评估如前所述的抗原特异性细胞响应(Yan等,Cancer Immunology Research(2013))(参见图3-A)。简而言之,用在PBS中稀释的小鼠IFN- γ (R&D Systems,Minneapolis,MN)的单克隆抗体包被ELISpot 96孔板,并在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。第二天,将板洗涤并在室温下用补充有1% BSA和5%蔗糖的PBS封闭2小时。以 2×10^5 个细胞/孔的输入细胞数,一式三份独立地添加重悬于完全培养基(补充有10% FBS的RPMI 1640)中的来自两个研究组的小鼠脾细胞。将由GenScript(Piscataway,NJ)合成并且各自含有由9个氨基酸重叠的15个氨基酸的两组肽(代表实施例1中描述的整个天然狗TERT(dTERT)蛋白或SYNCON dTERT蛋白)以2 μ g/ml肽的浓度汇集到四个库中。分别将5 μ g/ml的刀豆蛋白A用作阳性对照,并且将完全培养基用作阴性对照。将含有脾细胞和肽的板在37 $^{\circ}$ C,5% CO₂大气孵化器中温育24小时。然后洗涤板并加入生物素化的抗小鼠IFN- γ 检测抗体,并且将板在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。洗涤板,并根据制造商的说明书(ELISpot Blue Color Module,R&D Systems,Minneapolis,MN)进行显色。使用自动ELISPOT读取仪(Cellular Technology,Shaker Heights,OH)对板上的斑点计数。使斑点形成单位(SFU)的平均数量与 1×10^6 个脾细胞相适

应以用于数据显示。

[0194] 如图3-B所示,pGX1414-免疫的小鼠中针对四个SYNCON dTERT肽库的总响应是 448 ± 10^3 SFU/ 10^6 个脾细胞,这显著大于天然组的本底响应(17 ± 8 SFU/ 10^6 个脾细胞)($p < 0.05$)。此外,评估了pGX1414针对天然dTERT肽诱导的免疫响应。pGX1414免疫的小鼠中针对四个天然dTERT肽库的附加响应是 266 ± 98 SFU/ 10^6 个脾细胞,而天然组中的本底响应是 14 ± 4 SFU/ 10^6 个脾细胞($p < 0.05$),如图3-C所示。

[0195] 此实施例的结果表明,本发明的编码dTERT的疫苗能够在小鼠中产生针对匹配的SYNCON dTERT以及天然dTERT肽的免疫响应。

[0196] 此实施例的结果证明了本发明疫苗的产生。

[0197] 实施例3

[0198] pGX1415是包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列的DNA质粒,其编码SEQ ID NO:5。SEQ ID NO:5是狗端粒酶逆转录酶(dTERT)多肽,其具有7个消除端粒酶活性的点突变(从而导致取代:R579Y、D996Y、K633A、R638A、D719A、Y724A和D876A),可操作地连接至人CMV启动子(hCMV启动子)和牛生长激素聚腺苷酸化信号(bGH polyA)。质粒主链包括卡那霉素抗性基因(Kan^R)和质粒复制起点(pUC ori)。pGX1415的遗传元件列于表2中,并且pGX1415的示意图如图5所描绘。

[0199] 表2

元件:	碱基对
hCMV启动子	137-724
dTERT-PL编码序列	742-4164
bGH PolyA	4208-4432
卡那霉素抗性基因(Kan ^R)	4605-5399
pUC Ori	5698-6371

[0201] 通过在BamHI和XhoI位点处将SEQ ID NO:4克隆到pGX0001中来产生pGX1415。

[0202] 应理解先前详细描述和随附实施例仅是说明性的,并且不应视为对本发明的范围的限制,所述范围仅由随附权利要求和它们的等效物限定。

[0203] 对公开的实施方案的各种变化和修改将为本领域技术人员显而易见。可在不背离本发明的精神和范围的情况下做出此类变化和修改,包括但不限于与本发明的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或使用的方法有关的那些变化和修改。

[0204] 出于完整性的原因,本公开的各个方面在以下编号的条款中阐述:

[0205] 条款1.一种包含核酸分子的疫苗,所述核酸分子包含选自由以下组成的组的多核苷酸序列:SEQ ID NO:1的多核苷酸序列、与SEQ ID NO:1至少95%相同的多核苷酸序列;编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多核苷酸序列;和编码与SEQ ID NO:2至少95%相同的氨基酸序列的多核苷酸序列;或其任何组合。

[0206] 条款2.如条款1所述的疫苗,其中所述核酸分子包含所述SEQ ID NO:1的多核苷酸序列。

[0207] 条款3.如条款1所述的疫苗,其中所述核酸分子包含与SEQ ID NO:1 95%相同的多核苷酸序列。

[0208] 条款4.如条款1所述的疫苗,其中所述核酸分子包含所述编码SEQ ID NO:2的氨基

酸序列的多核苷酸序列。

[0209] 条款5.如条款1所述的疫苗,其中所述核酸分子包含编码与SEQ ID NO:2 95%相同的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0210] 条款6.如条款1-5中任一项所述的疫苗,其中所述核酸分子是质粒。

[0211] 条款7.如条款6所述的疫苗,其中所述质粒包含SEQ ID NO:3的核酸序列。

[0212] 条款8.如条款1-7中任一项所述的疫苗,其还包含佐剂。

[0213] 条款9.如条款8所述的疫苗,其中所述佐剂是IL-12、IL-15、IL-28或RANTES。

[0214] 条款10.一种在哺乳动物中诱导针对端粒酶逆转录酶(TERT)的免疫响应的方法,所述方法包括向有需要的哺乳动物施用如权利要求1-9中任一项所述的疫苗,由此所述核酸分子在所述哺乳动物中表达并且诱导以下免疫响应中的一种或多种:

[0215] (a) 特异于TERT的体液免疫响应,

[0216] (b) 炎性响应,包括与未施用所述疫苗的哺乳动物相比,提高的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)水平,和

[0217] (c) 特异于TERT的细胞免疫响应。

[0218] 条款11.如条款10所述的方法,其中TERT是狗TERT(dTERT)。

[0219] 条款12.如条款10-11中任一项所述的方法,其中哺乳动物患有癌症。

[0220] 条款13.一种在哺乳动物中治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的哺乳动物施用包含如权利要求1-9中任一项所述的疫苗和药学上可接受的载体的组合物,由此所述核酸分子在所述哺乳动物中表达并且所述癌症得到治疗。

[0221] 条款14.如条款10-13中任一项所述的方法,其中疫苗通过电穿孔施用。

[0222] 条款15.如条款10-14中任一项所述的方法,其中哺乳动物是狗。

[0223] 条款16.如条款13-15中任一项所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:黑素瘤、前列腺癌、肝癌、宫颈癌、复发性呼吸道乳头状瘤病(RRP)、肛门癌、头颈癌、血癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、肺癌、非小细胞肺癌、食道鳞状细胞癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胃癌、肝癌、脑癌、胶质母细胞瘤、胰腺癌、滑膜癌、睾丸癌和胃癌。

[0224] 条款17.一种核酸分子,其包含SEQ ID NO:1的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:1至少95%相同的多核苷酸序列。

[0225] 条款18.一种核酸分子,其包含编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多核苷酸。

[0226] 条款19.如条款17或条款18所述的核酸分子,其包含SEQ ID NO:3的多核苷酸序列。

[0227] 条款20.一种多肽,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列、SEQ ID NO:5的氨基酸序列、与SEQ ID NO:2至少95%相同的氨基酸序列。

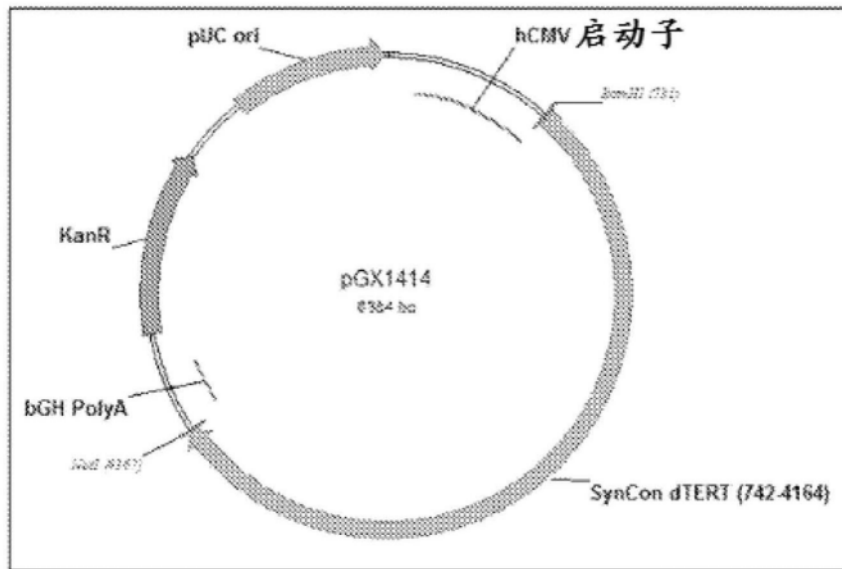


图1

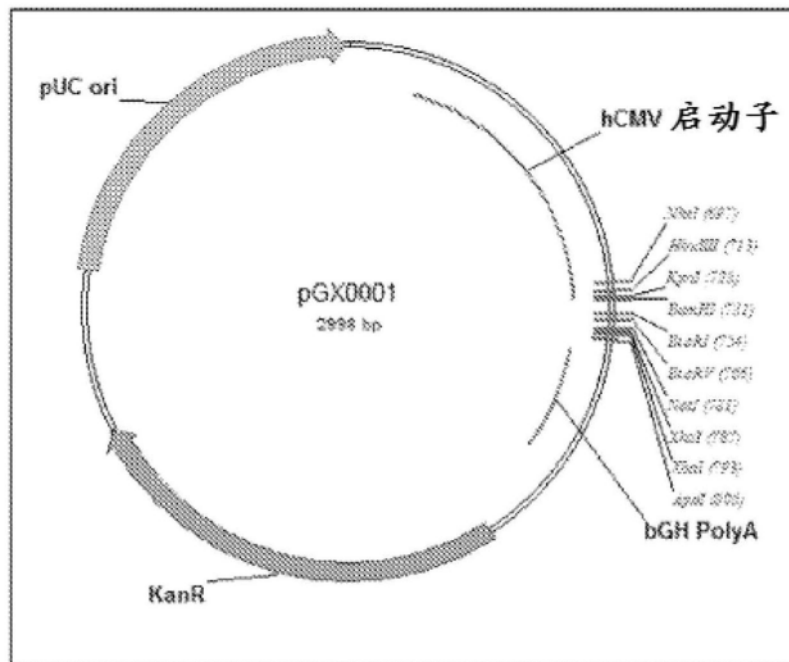


图2

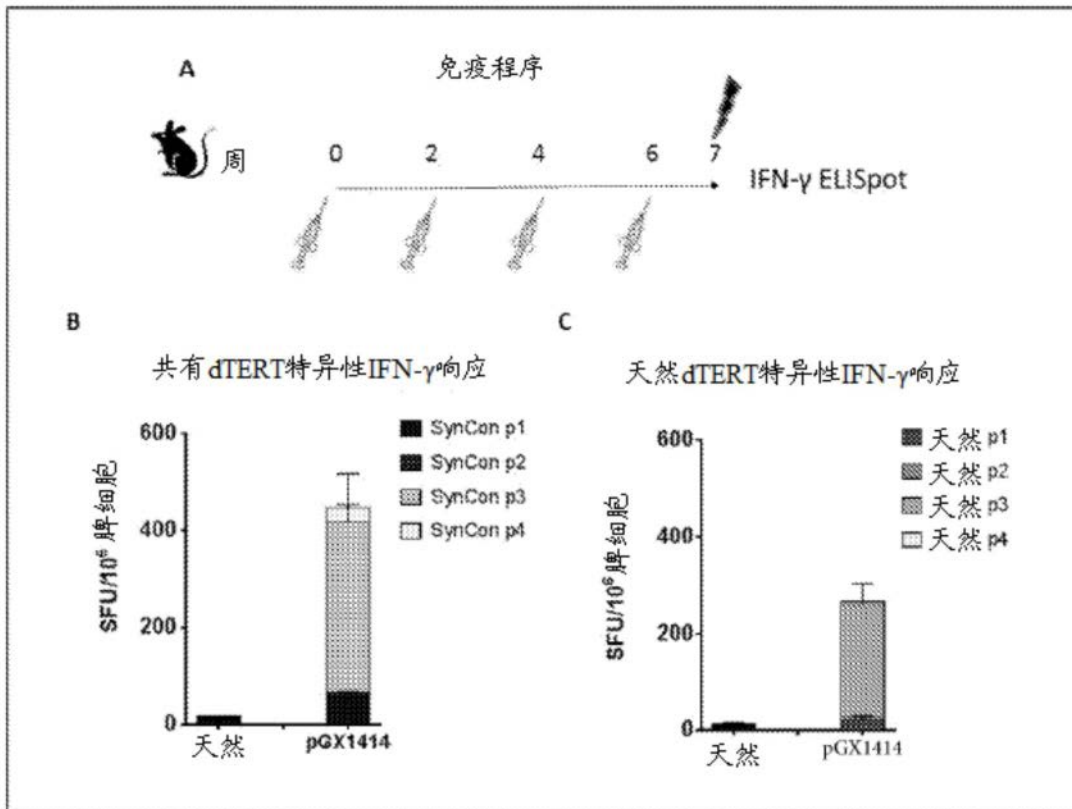


图3

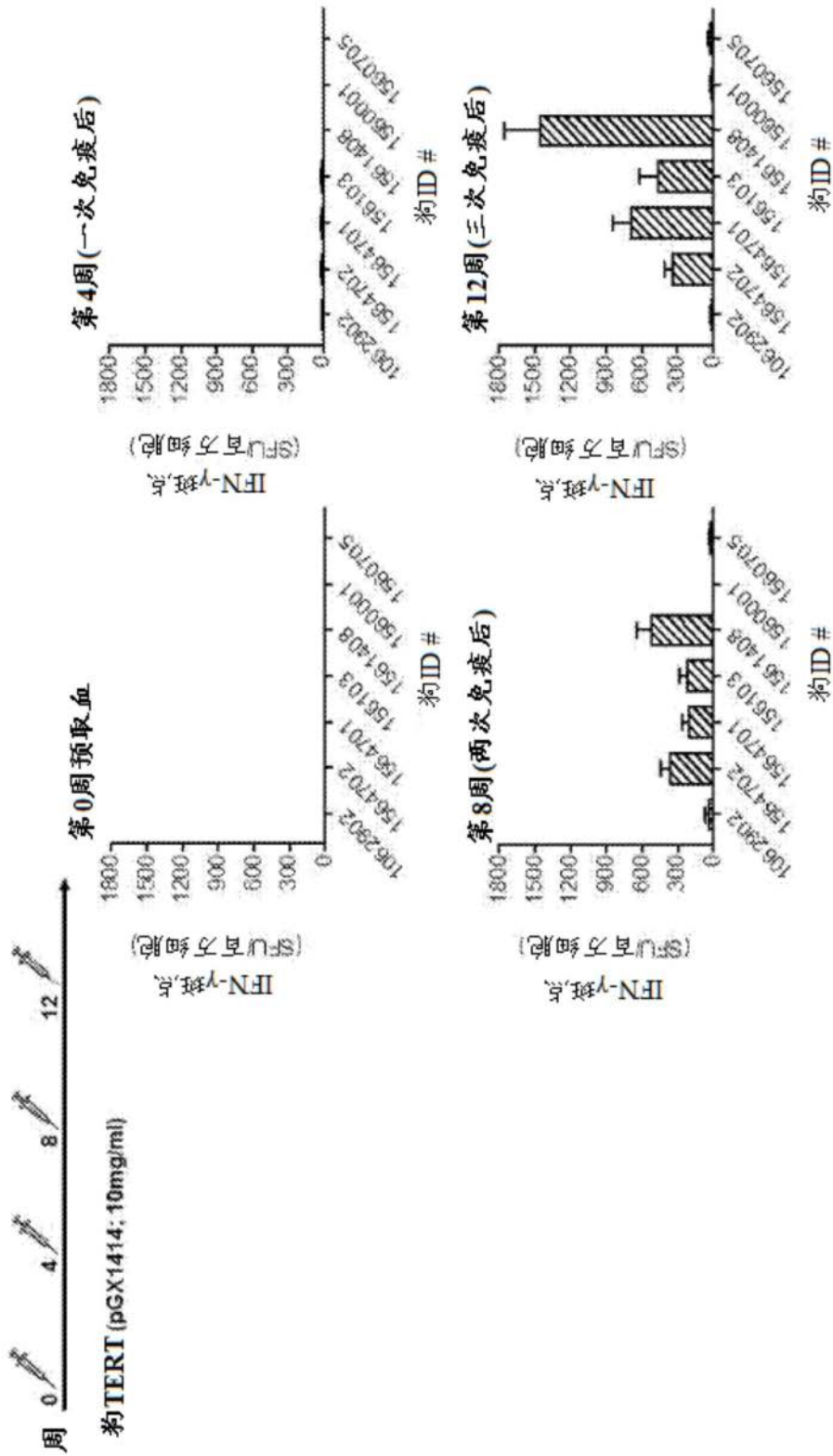
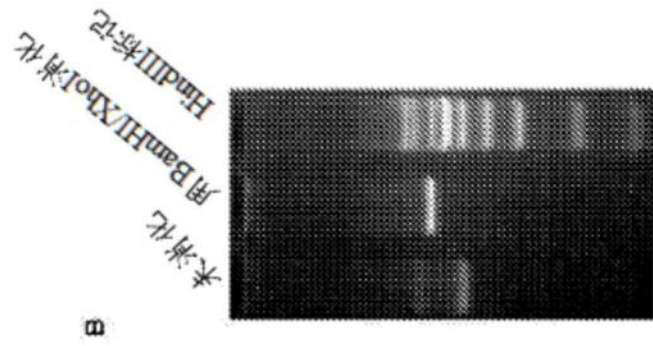
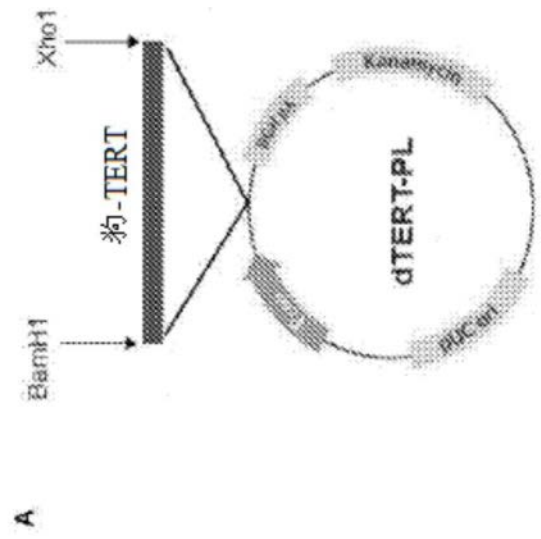


图4



B



A

图5

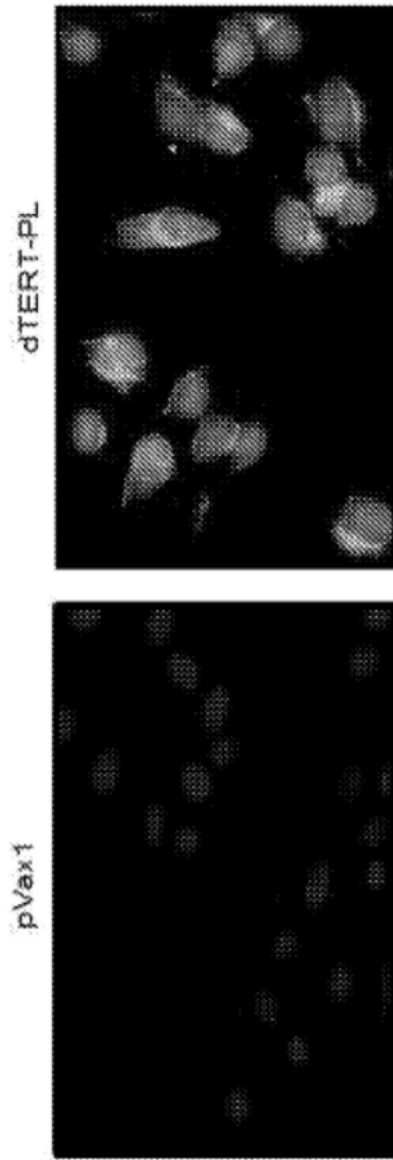


图6

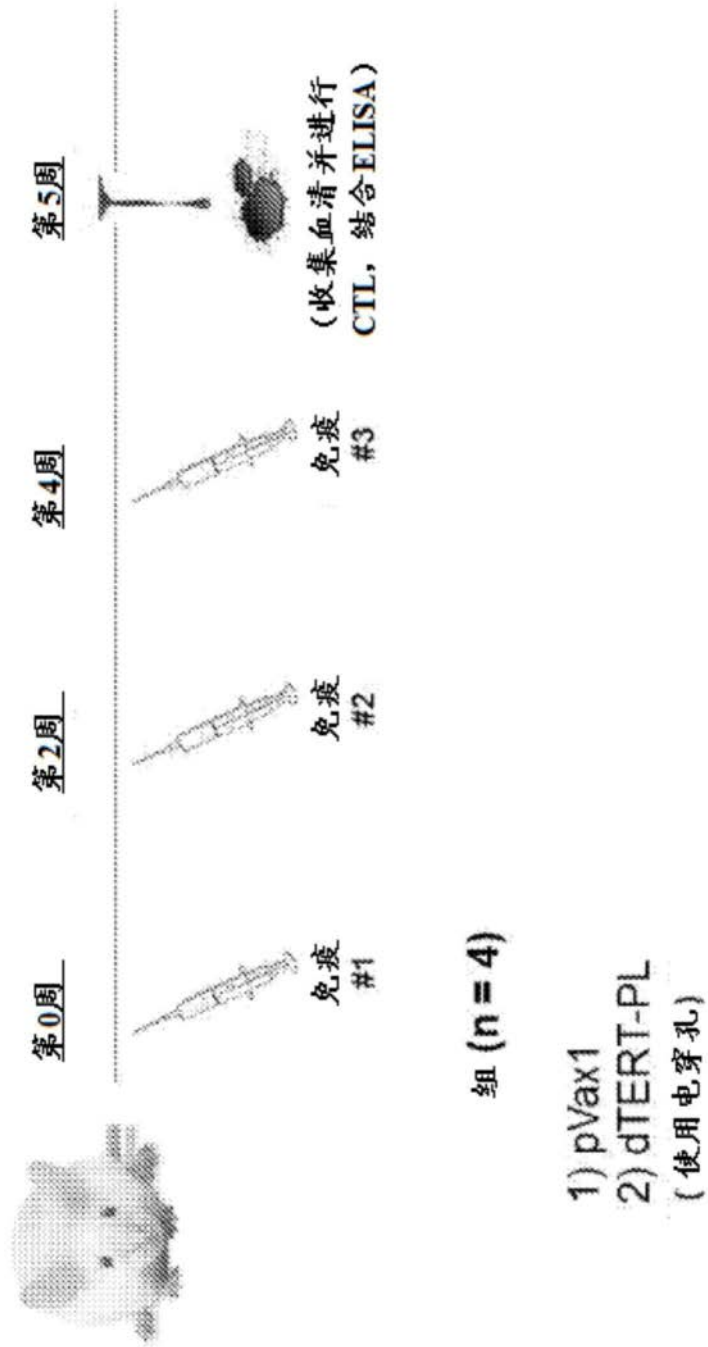


图7

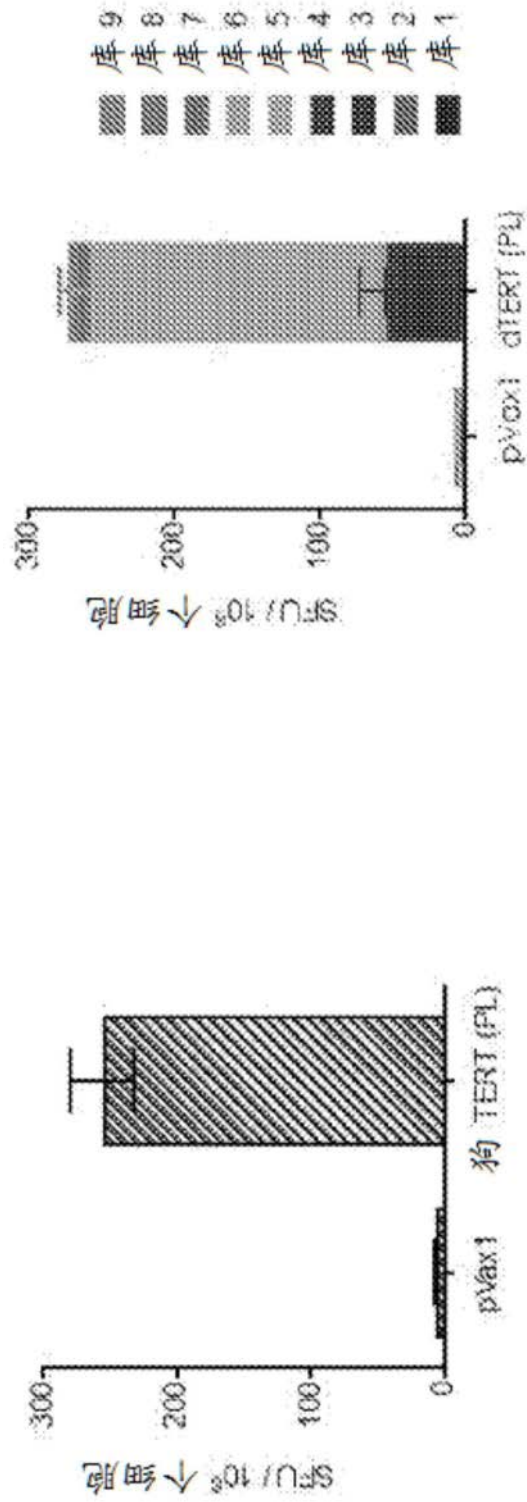


图8

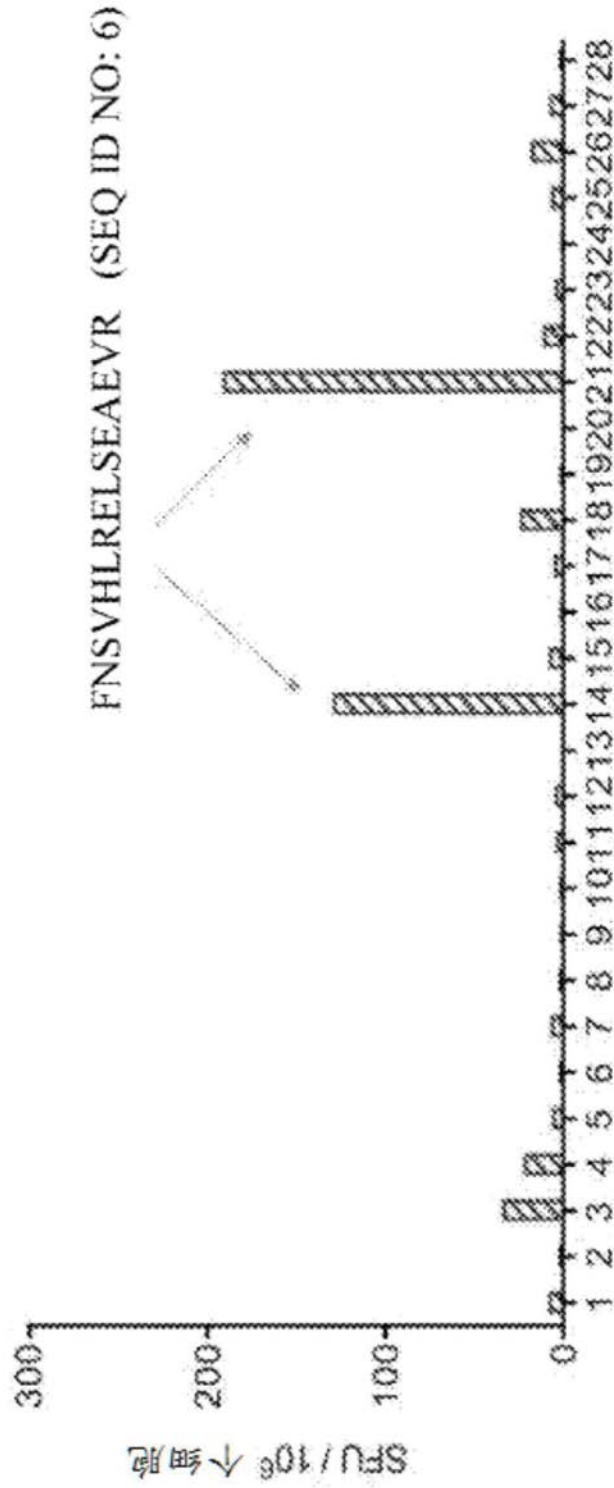


图9

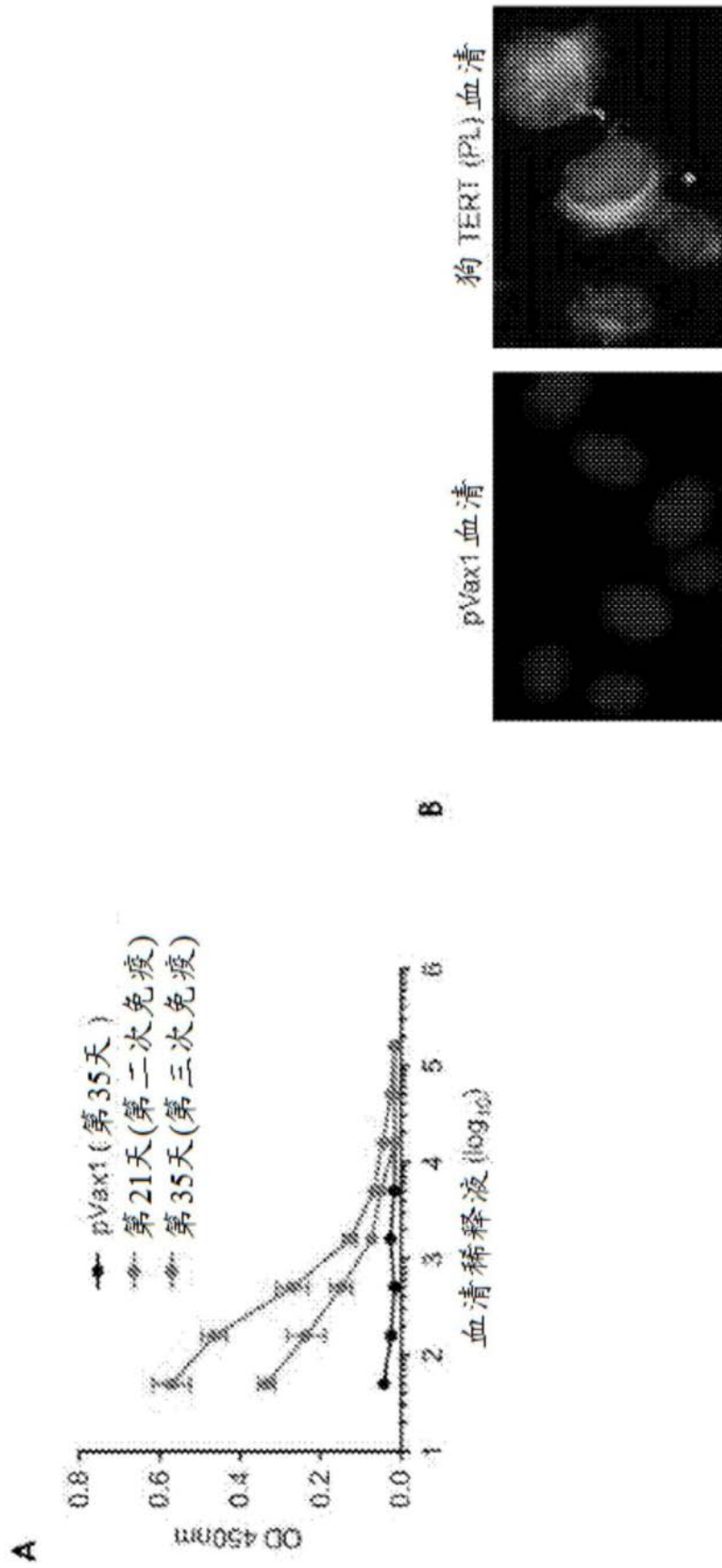


图10