



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103917243 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201280050948.7

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2012.10.17

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 103917243 A

C07K 14/705 (2006.01)

(43) 申请公布日 2014.07.09

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 2010027828 A2, 2010.03.11

PA201170574 2011.10.17 DK

Benavides et al.. Comparison of different HER2/neu vaccines in adjuvant breast cancer trials: implications for dosing of peptide vaccines.《Expert Rev. Vaccines》.2011, 第10卷(第2期),

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Andersen et al.. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptosis Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients.《CANCER RESEARCH》.2000, 第61卷

2014.04.17

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 奚静

PCT/DK2012/050386 2012.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/056716 EN 2013.04.25

(73) 专利权人 I0生物技术公司

地址 丹麦哥本哈根

权利要求书1页 说明书37页
序列表6页 附图19页

(72) 发明人 梅斯·哈尔德·安德森

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

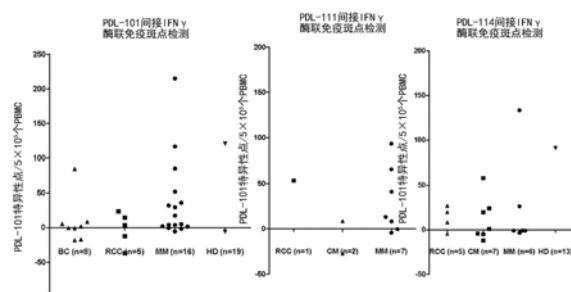
代理人 陈玉平 姜建成

(54) 发明名称

基于PD-L1的免疫疗法

(57) 摘要

本发明涉及预防和治疗临床病症的领域，所述临床病症包括癌症、自身免疫疾病和传染病。具体而言，本发明提供了包含PD-L1或其肽片段的疫苗组合物，所述疫苗组合物能够激发可用于治疗癌症、自身免疫疾病或传染病的免疫反应。



1. 疫苗组合物,其包含

a) 免疫原性活性肽片段,所述免疫原性活性肽片段由SEQ ID NO:1的PD-L1的9至19个氨基酸的连续序列组成,其中所述肽片段包含序列SEQ ID NO:2;和

b) 佐剂;

所述疫苗组合物用作药物,其中如ELI-SPOT所测定的,所述肽片段能够诱导PD-L1特异性的释放IFN- γ 的T细胞。

2. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其中所述免疫原性活性肽片段包含序列FMTYWHLLNAFTVTVPKDL。

3. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其中所述免疫原性活性肽片段由SEQ ID NO:2或FMTYWHLLNAFTVTVPKDL组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物用于治疗选自癌症、感染或自身免疫性疾病的病症。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的疫苗组合物,其中所述佐剂选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂和咪唑并喹啉。

6. 根据权利要求4所述的疫苗组合物,其中所述佐剂选自基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂和咪唑并喹啉。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的疫苗组合物,其中所述佐剂是Montanide ISA佐剂。

8. 根据权利要求4中任一项所述的疫苗组合物,其中所述佐剂是Montanide ISA佐剂。

9. 根据权利要求5中任一项所述的疫苗组合物,其中所述佐剂是Montanide ISA佐剂。

10. 根据权利要求6中任一项所述的疫苗组合物,其中所述佐剂是Montanide ISA佐剂。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的疫苗组合物在制造用于治疗或预防其中表达了PD-L1的癌症疾病的药物中的用途。

12. 根据权利要求11所述的用途,其与其他癌症疗法组合。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述其他疗法选自化疗、放疗、用免疫刺激物质治疗、基因治疗、用抗体治疗和使用树突细胞治疗。

基于PD-L1的免疫疗法

[0001] 本申请中引用的全部专利和非专利参考文献通过引用方式完整地并入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及预防和治疗临床病症的领域，所述临床病症包括癌症、自身免疫疾病和传染病。具体而言，本发明提供了包含PD-L1或其肽片段的疫苗组合物，所述疫苗组合物能够激发可用于治疗癌症、自身免疫疾病或传染病的免疫反应。

【0003】发明背景

[0004] 免疫系统具有识别并摧毁肿瘤细胞的能力；然而，尽管瘤性转化与免疫原性抗原表达有关，但免疫系统经常不能有效地针对这些抗原发生反应。免疫系统对这些抗原变得耐受。当这种情况出现时，肿瘤细胞不可控地增殖，导致恶性癌形成，伴随受累个体预后不良。为了成功的进行癌症免疫疗法，必须解决所获得的耐受性状态。

[0005] 系列证据表明，T细胞是针对抗癌细胞的免疫反应中的主要效应子。免疫调节蛋白如吲哚胺2,3-双加氧酶 (IDO)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡1配体1 (PD-L1) 在抗癌免疫反应的免疫抑制和耐受性诱导中发挥重要作用。CTLA-4是T细胞反应的关键负向调节物，其可以限制抗肿瘤免疫反应。最近，CTLA-4抗体伊匹木单抗在临床III期研究中显示效果后由FDA以及EMEA批准用于治疗黑色素瘤。对抗肿瘤特异性免疫力和干扰有效抗癌免疫疗法的另一种核心机制需要致耐受性树突细胞 (DC) 从中发挥重要作用，从而使免疫反应偏离有效免疫的特定环境。

[0006] 编程死亡-1 (PD1) 是调节性表面分子，它传输对维持T细胞针对其同族抗原的功能性沉默重要的抑制性信号。其配体，称作PD-L1和PD-L2，或B7-H1和B7-H2，表达炎性微环境中的APC、肿瘤细胞、胎盘和非造血性细胞上。干扰PD-1或其配体PD-L1增加抗肿瘤免疫力。PD-L1的上调似乎是癌症可以用来规避宿主免疫系统的机制。PD-L1在肿瘤上的表达与许多癌症的不良临床结果相关，所述癌症包括胰癌、肾细胞癌，卵巢癌、头颈癌和黑色素瘤 (Hamanishi等人, 2007, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104:3360-3365; Nomi等人, 2007, Clin.Cancer Res.13:2151-2157; Hino等人, 2010, Cancer.116:1757-1766)。因此，分析来自肾细胞癌患者的196份肿瘤试样发现PD-L1的高度肿瘤表达与肿瘤侵入性增加和增加4.5倍的死亡风险相关 (Thompson等人, 2004, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:17174-17179)。具有较高PD-L1表达的卵巢癌患者比具有较低PD-L1表达的那些患者具有明显较差的预后。在PD-L1表达和表皮内CD8⁺T-淋巴细胞计数之间观察到了反相关性，这表明肿瘤细胞上的PD-L1可以抑制抗肿瘤CD8⁺T细胞 (Hamanishi等人, 2007, 见上文)。

【0007】发明简述

[0008] 本发明解决了癌症的免疫抑制问题，这基于发明人令人惊讶的发现了癌症患者中针对表达PD-L1的细胞的自发性细胞毒免疫反应。这些研究结果开启了可总体适用于控制癌症疾病的新的治疗和诊断方法。

[0009] 有趣地，所述研究结果不限于癌症，还可用于以存在表达PD-L1的不利细胞为特征的其他临床病症。

[0010] 本发明通过直接杀死表达PD-L1的癌细胞和通过杀死表达PD-L1的调节性细胞,而靶向癌症疾病。这一点通过使T细胞能够识别表达PD-L1的细胞而实现。同样地,当临床病症是感染时,使T细胞能够杀死表达PD-L1的APC/DC。

[0011] 因此,癌细胞和APC中免疫抑制酶PD-L1的表达与靶向这些表达PD-L1的细胞的本发明方法关联。这种方法,尤其由于它杀死APC/DC,而与本领域的普遍意见抵触,其通常尝试抑制PD-L1以便消除APC/DC周围的耐受性环境,同时保留认为发动有效免疫反应所需的这些细胞。

[0012] 另外,针对表达PD-L1的细胞的自发性细胞毒免疫反应的研究结果尤为令人惊讶,原因是表达PD-L1的细胞拮抗其他免疫疗法的期望效果。因此,靶向PD-L1和靶向肿瘤的免疫疗法的组合是高度协同的。

[0013] 体内存在对PD-L1特异的T细胞反应表明,癌症患者能够应答于存在的PD-L1肽而在体内产生针对PD-L1的T细胞反应。因此满足了产生T细胞反应的两个条件:T细胞存在于癌症患者中和它们具有扩充能力,这在本申请中显示。这符合免疫学领域的常识:提供额外PD-L1蛋白质或PD-L1肽将导致PD-L1特异性T细胞反应的产生。

[0014] 与B细胞上单独可以识别抗原的膜结合型抗体相反,T细胞识别一种复合物配体,所述复合物配体包含与称作主要组织相容性复合物(MHC)的蛋白质结合的抗原肽。在人类中,这种分子称作人白细胞抗原(HLA)。HLA I类分子以细胞内部蛋白质降解产生的肽为对象并且将这些在细胞表面的肽呈递至T细胞。因此,这使得T细胞能够扫描细胞变异。当T细胞在HLA分子环境下遭遇抗原时,它经历克隆性扩充并分化成记忆T细胞和各种效应T细胞。因此,自发性免疫反应的鉴定是抗原作为T细胞靶的证据。这证明特定T细胞已经被活化并已经在体内得到扩充。

[0015] 在本申请实施例1和3中使用的酶联免疫斑点(ELISPOT)方法是非常敏感的测定法,其证明了存在体内免疫反应,不存在原初T细胞。同样地,肽-MHC-四聚体已成功地用来鉴定并研究对肿瘤相关抗原(TAA)特异的T细胞,所述T细胞内源地或在患者中接种后形成。四聚体也已经用来分离并扩充用于过继细胞免疫疗法的TAA特异性T细胞。本申请证明了PD-L1-四聚体特异性T细胞的存在(见实施例3),还证明了体内进行的PD-L1反应。

[0016] 本发明涉及一种用作药物的疫苗组合物,所述疫苗组合物包含SEQ ID NO:1的PD-L1或与之相同至少70%的功能同源物或免疫原性活性肽片段或者编码所述PD-L1、其所述功能同源物或所述肽片段的核酸,所述免疫原性活性肽片段包含PD-L1或其所述功能同源物的至少8个氨基酸的连续序列;和佐剂。

[0017] 在本发明涉及一种包含疫苗组合物和其他免疫刺激性组合物的组分套装的方面,提供了基于以上所公开疫苗的免疫疗法组合的协同效应。

[0018] 本发明还提供了本发明疫苗与其他癌症疗法如化疗药组合的方面。

[0019] 本发明还提供了本发明疫苗与其他抗感染治疗如免疫疗法和/或抗生素组合的方面。

[0020] 本发明还提供了通过落在本发明范围内的上文描述的任何手段治疗临床病症如癌症或感染的方法;所述手段包括向患有该临床病症的个体施用有效量如上文公开的疫苗组合物或包含前述疫苗连同另一种免疫刺激性组合物和/或化疗药的组分套装。

[0021] 因此本发明的目的还在于PD-L1或其包含PD-L1或其功能同源物的连续序列的免

疫原性活性肽片段或以上疫苗组合物在制造用于治疗或预防癌症疾病的药物中的用途。

[0022] 附图简述

[0023] 图1显示通过IFN- γ ELISPOT的测量,证明存在针对PDL101、PDL111和PDL114的T细胞反应。将PDL特异性点的平均数目(扣减在不添加肽情况下的点之后)计算为每位患者每 5×10^5 个PBMC的数量(白三角形)。分析来自乳腺癌患者(BC)、肾细胞癌患者(RCC)、恶性黑色素瘤患者(MM)以及健康个体(HD)的PBMC。将利用或不利用PDL1肽的细胞以每孔 5×10^5 个细胞一式两份铺种之前,用肽刺激T细胞一次。

[0024] 图2显示通过ELISPOT测量证明存在针对PDL101的T细胞反应:(a) 将PDL-101特异性点的平均数目(扣减在不添加肽情况下的点之后)计算为每位患者每 5×10^5 个PBMC的数量(白三角形)。分析来自乳腺癌患者(BC)、肾细胞癌患者(RCC)、恶性黑色素瘤患者(MM)以及健康个体(HD)的PBMC。分离PMBC并且将利用或不利用PDL101肽的细胞直接离体以每孔 5×10^5 个细胞一式两份铺种。(b) 通过TNF- α ELISPOT所测量的针对PDL101的T细胞反应。将PDL特异性点的平均数目(扣减在不添加肽情况下的点之后)计算为每位患者每 5×10^5 个PBMC的数量(白三角形)。分析来自乳腺癌患者(BC)、肾细胞癌患者(RCC)、恶性黑色素瘤患者(MM)以及健康个体(HD)的PBMC。将利用或不利用PDL101肽的细胞以每孔 5×10^5 个细胞一式两份铺种之前,用肽刺激T细胞一次。

[0025] 图3显示PDL101特异性T细胞的功能能力:(a) 通过 ^{51}Cr -释放测定法测量利用T细胞大体积培养物(T-cell bulk culture)以不同的效应子对靶比率对用PDL101肽(红色)或无关肽(蓝色)(HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄)脉冲标记(pulse)的T2-细胞的溶解。(b) 通过 ^{51}Cr -释放测定法测量利用T细胞大体积培养物以不同的效应子对靶比率对乳腺癌细胞系MDA-MB-231的溶解。

[0026] 图4显示针对PD-L1的天然T细胞反应。(A) 通过IFN- γ ELISPOT测量的针对PD-L101肽(PDL115-23;LLNAFTVTV)的T细胞反应。一位肾细胞癌(RCC)患者和两位恶性黑色素瘤(MM)患者针对PD-L101的ELISPOT反应的例子。(B) 总计,来自23位癌症患者和24位健康供体的PBMC用肽刺激一次并使用IFN- γ ELIPOT筛选针对PD-L101的反应。将PD-L101特异性点的平均数目(扣减在不添加肽情况下的点之后)计算为每位患者每 5×10^5 个PBMC的数目。Mann-Whitney检验揭示与健康供体相比,癌症患者中PD-L101特异性T细胞反应频率较高,p-值=0.06。(C) 来自六位黑色素瘤患者(MM.03、MM.04、MM.05、MM.13和MM.135)、一位乳腺癌患者(CM.21)和一位肾细胞癌患者(RCC.46)的PBMC中响应于PD-L101(黑色棒)或在无肽情况下(灰色棒)的IFN- γ ELISPOT的例子。(D) 来自六位黑色素瘤患者(MM.03、MM.04、MM.05、MM.13和MM.19)、一位乳腺癌患者(CM.21)和一位肾细胞癌患者(RCC.46)的PBMC中响应于PD-L101(黑色棒)或在无肽情况下(灰色棒)的TNF- α ELISPOT。全部实验均一式三份进行并且分布不拘再抽样(DFR)检验证实了针对PD-L101的显著反应。

[0027] 图5显示针对离体PD-L1的T细胞反应。(A) 黑色素瘤患者(MM.03)中通过离体IFN- γ ELISPOT所测量的针对PD-L101肽(PDL115-23;LLNAFTVTV)的T细胞反应的例子。(B) 来自两位恶性黑色素瘤患者(MM.03和MM.04)和一个肾细胞癌患者(RCC.46)的PBMC中应答于PD-L101(黑色棒)或在无肽情况下(灰色棒)的离体IFN- γ ELISPOT。全部实验均一式三份进行并且分布不拘再抽样(DFR)检验证实了针对PD-L101的显著反应。(C) 与下述各种肽交换的UV敏感配体(KILGFVFJV)的ELISA分析:CMV/HLA-A2(pp65pos495-503;NLVPMVATV)、HIV/

HLA-A2 (pol476-484; ILKEPVHGV) 和PD-L101 (PDL115-23; LLNAFTVTV) 、无UV (不暴露于UV光) 和无肽 (在无拯救肽 (rescue peptide) 的情况下)。(D) 通过使用四聚体HLA-A2/PD-L101-PE、HLA-A2/HIV-PE以及抗体CD8-太平洋蓝/APC别藻蓝蛋白的流式细胞术染色法可视化的, PD-L101特异性T细胞的四聚体分析;来自一位乳腺癌患者 (CM.21) (顶部) 和一位恶性黑色素瘤患者 (MM.05) (底部) 的PBMC当中PD-L101特异性CD8T细胞的两个例子。直接离体 (左侧)、在一次体外肽刺激后 (中部) 和在三次肽刺激后 (右侧) 进行染色。

[0028] 图6显示PD-L1特异性T细胞的细胞毒功能性。(A) ^{51}Cr -释放测定法,其代表在第三次肽刺激后,CM.21T细胞培养物溶解的用PD-L101肽 (PDL115-23) 或无关HIV肽 (HIV-1pol476-484) 脉冲标记的T2-细胞的百分数。(B) 在三次肽刺激后,MM.05T细胞培养物溶解的用PD-L101肽 (PDL115-23) 或无关HIV肽 (HIV-1pol476-484) 脉冲标记的T2-细胞的百分数。(C) 通过GrBELISPOT所测量的针对PD-L101的溶细胞反应。显示来自三位黑色素瘤患者 (MM.03,MM.53和MM.135) 的PBMC中响应于PD-L101 (黑色棒) 或在无肽情况下 (灰色棒) 的GrB ELISPOT应答。全部实验均一式三份进行并且分布不拘再抽样 (DFR) 检验显示了两位患者中针对PD-L101的显著反应。

[0029] 图7显示针对PD-L1⁺癌细胞的溶细胞活性。(A) 通过 ^{51}Cr -释放所测定的,在不同的效应子对靶比率下,PD-L101特异性T细胞培养物 (CM.21) 在具有或没有IFN- γ 处理的情况下对HLA-A2⁺黑色素瘤细胞系MM.06 (左) 或MM.07 (右) 的溶解。(B) 显示在具有或没有IFN- γ 处理的情况下MM.07和MM.06上PD-L1表面表达的直方图。(C) 富含PD-L101的T细胞培养物对HLA-A2⁺黑色素瘤细胞系MM.06 (方块) 或MM.07 (圆圈) 的溶解。

[0030] 图8显示PD-L1依赖性树突细胞的溶解。(A-B) PD-L1特异性T细胞培养物 (顶部) 溶解无siRNA的自体mDC (黑色圆圈)、用针对PD-L1的siRNA (0.05nmol (黑色方块)、0.10nmol (黑色星号) 和0.25nmol (黑色三角形)) 和用对照siRNA (白色圆圈) 转染的mDC的百分数。(C) 流式细胞分析,其显示在无转染情况下的mDC上和用针对PD-L1以三个不同浓度 (0.05nmol、0.10nmol和0.25nmol) 转染的mDC上以及用对照siRNA转染的DC上PD-L1表面表达情况。

[0031] 图9显示非专业抗原呈递细胞的TAP非依赖性交叉呈递。(A) 通过标准 ^{51}Cr -释放测量的,PD-L101特异性T细胞培养物对用PD-L101肽 (PDL115-23) (黑色方块)、PDLlong1 (PD-L19-28; FMTYWHLLNAFTVTVPKDL) (黑色星号)、PDLlong2 (PDL1242-264; VILGAILLCLGVALTFIFRLRK) (黑色三角形)、PD-L1蛋白 (白色方块) 或无关HIV肽 (HIV-1pol476-484) (灰色圆圈) 脉冲标记的HLA-A2⁺EBV转染的B-细胞系 (KIG-BCL) 的溶解。(B) 通过标准 ^{51}Cr -释放测量的,PD-L101特异性T细胞培养物对用PD-L101肽 (PDL115-23) (黑色方块)、PDLlong1 (PD-L19-28; FMTYWHLLNAFTVTVPKDL) (黑色星号)、PDLlong2 (PDL1242-264; VILGAILLCLGVALTFIFRLRK) (黑色三角形)、PD-L1蛋白 (白色方块) 或无关HIV肽 (HIV-1pol476-484) (灰色圆圈) 脉冲标记的T2-细胞的溶解。(C) 通过用PDLlong1或PDLlong1+HLA-A2阻断抗体脉冲标记的T2-细胞的溶解,来评估PD-L1特异性T细胞的HLA-A2限制性杀死作用。(D) 显示PD-L1在KIG-BCL和T2细胞系上表面表达的柱状图。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明的主要目的是提供一种包含PD-L1或其免疫原性活性多肽片段的疫苗组合物,其用作药物用于预防临床病症、降低该临床病症的风险或治疗该临床病症,其中所述临床病症优选地选自癌症、传染病和自身免疫疾病。

[0034] 定义

[0035] 佐剂:在与PD-L1或其免疫原性活性肽片段的混合施用至个体时增加了针对PD-L1或其所述肽片段的免疫反应的任何物质。优选地,所述个体是人类并且优选地,所述免疫反应是T细胞反应。

[0036] 抗体:免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的活性部分。抗体是例如完整免疫球蛋白分子或其保留免疫活性的片段。

[0037] 抗原:能够与克隆分布的免疫受体(T细胞或B-细胞受体)结合的任何物质。通常,肽、多肽或多聚多肽。抗原优选地能够激发免疫反应。

[0038] APC:抗原呈递细胞。APC是在其表面上展示与MHC复合的外来抗原的细胞。T细胞可以使用它们的T细胞受体(TCR)识别这种复合物。APC分成两类:专业型(其存在三个类型:树突细胞、巨噬细胞和B细胞)或非专业型(不以组成型方式表达与原初T细胞相互作用所需的主要组织相容性复合物蛋白;这些蛋白质仅在通过某些细胞因子如IFN- γ 刺激非专业型APC时才表达)。

[0039] 加强:为了通过加强接种或给药强化免疫,给予额外剂量的免疫剂,如疫苗,所述免疫剂在起始剂量后的某个时间给予以维持由先前剂量的同一药剂激发的免疫反应。

[0040] 癌症:本文中,任何良性或恶性的前瘤性或瘤性疾病,其中“瘤性”指细胞异常增殖。

[0041] 载体:与抗原结合以辅助诱导免疫反应的实体或化合物。

[0042] 嵌合蛋白:由核苷酸序列编码的基因工程化蛋白,其中所述核苷酸序列通过将两个或更多个完整或部分基因或一系列(非)随机核酸剪接在一起产生。

[0043] 临床病症:需要就医的病症,本文中尤其与PD-L1表达相关的病症。这类病症的例子包括癌症、传染病或自身免疫疾病。

[0044] CTL:细胞毒T淋巴细胞。表达CD8连同T细胞受体并因此能够响应于由I类分子呈递的抗原的T细胞亚组。

[0045] 细胞因子:本文中非限定性的使用的生长或分化调节物,并且不应当限制对本发明和权利要求的解释。除细胞因子之外,黏附分子或附属分子或其任意组合可以单独使用或与细胞因子组合使用。

[0046] 递送载具:可以借以将核苷酸序列或多肽或二者从至少一种介质运输至另一种介质的实体。

[0047] DC:树突细胞。(DC)是免疫细胞并且形成哺乳动物免疫系统的一部分。它们的主要功能是加工抗原物质并在表面上将它呈递给免疫系统的其他细胞,因此作为抗原呈递细胞(APC)发挥作用。

[0048] 片段:用来指核酸或多肽的非全长部分。因而,片段本身分别也是核酸或多肽。

[0049] 功能同源物:功能同源物可以是与野生型多肽显示出至少一些序列同一性并已经保留野生型多肽功能性的至少一个方面的任何多肽。本文中,PD-L1的功能同源物具有诱导针对表达PD-L1的细胞的T细胞免疫反应的能力。

[0050] 个体:通常指任何鸟类、哺乳动物、鱼类、两栖类或爬行类的物种或亚种,优选地是哺乳动物,最优选地是人类。

[0051] 感染:本文中,术语“感染”指任何种类的产生免疫反应的临床病症并因此包括感

染、慢性感染、自身免疫病和变应性炎症。

[0052] 分离:与本文中公开的核酸、多肽和抗体联系使用时,‘分离’指这些实体已经被鉴定并分离和/或从其天然环境(一般是细胞环境)的组分回收。本发明的核酸、多肽和抗体优选地是分离的,并且本发明的疫苗和其他组合物优选地包含分离的核酸、多肽或分离的抗体。

[0053] MHC:主要组织相容性复合物,存在两个主要亚类MHC I类和II类。

[0054] 核酸构建体:基因工程化的核酸。一般包含几种元件,如基因或基因片段、启动子、增强子、终止子、聚腺苷酸尾、接头、多接头、可操作性接头、多克隆位点(MCS)、标记、终止密码子、其他调节元件、内部核糖体进入位点(IRES)或其他。

[0055] 病原体:特定疾病致病因子,尤其是可以对其宿主造成疾病的生物因子如病毒、细菌、朊病毒或寄生虫,也称作感染性物质。

[0056] PBMC:外周血单核细胞(PBMC)是具有圆形胞核的血细胞,如淋巴细胞或单核细胞。这些血细胞是免疫系统抗击感染并适应于入侵者的关键组分。淋巴细胞群体由T细胞(CD4和CD8阳性约75%)、B细胞和NK细胞(合并约25%)组成。

[0057] 药用载体:还称作赋形剂或稳定剂,使用剂量和浓度对其暴露的细胞或个体无毒。经常地,生理可接受载体是pH缓冲的水溶液。生理可接受载体的例子包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;络合剂如EDTA;糖醇如甘露醇或山梨醇;成盐反离子如钠;和/或非离子表面活性剂如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。

[0058] 多个:至少两个。

[0059] 启动子:DNA链中RNA聚合酶与之结合以启动一个或多个近旁结构基因的信使RNA转录的结合位点。

[0060] Treg:调节性T细胞/T淋巴细胞

[0061] 疫苗:能够在动物中诱导免疫反应的物质或组合物。疫苗在本文中也称作“疫苗组合物”或称作“免疫原性组合物”。根据本发明,所述免疫反应优选地是T细胞反应。本发明的疫苗可以作为预防性药物和/或治疗性药物给予。

[0062] 变体:给定参考核酸或多肽的“变体”指与所述参考核酸或多肽显示某种程度的序列同一性但是与参考核酸或多肽不同的核酸或多肽。

[0063] PD-L1

[0064] 本发明的PD-L1是“程序性细胞死亡1”的配体。人PD-L1是

[0065] PD-L1以高水平在癌细胞中以及在调节性T细胞中表达。因此,本发明的疫苗组合物可用于预防和/或治疗以存在表达高水平的PD-L1的不利细胞为特征的临床病症。

[0066] 因此,不仅癌症,还有广泛的感染和尤其慢性感染的感染,以及自身免疫疾病,均是与本发明有关的临床病症。

[0067] 由于表达PD-L1的T细胞拮抗其他免疫疗法的期望效果,所以(例如通过接种)靶向表达PD-L1的细胞在作用方面与其他抗癌免疫疗法高度地协同。在本申请中证明,CTL限定的PD-L1表位广泛地适用于治疗性接种并因此具有巨大的免疫治疗价值。

[0068] 因此,本发明的一个方面是提供一种包含PD-L1或其免疫原性活性多肽片段的疫苗组合物,用作治疗临床病症的药物。所述临床病症可以是癌症并且本发明的另一个方面是预防癌症、降低癌症的风险或治疗癌症。另一个方面涉及本发明疫苗组合物与其他药物如免疫治疗药物和/或化疗药组合使用。然而,一个方面涉及如本文所公开的疫苗组合物用于治疗病毒源和/或微生物源疾病的用途并且进一步涉及所述疫苗与其他药物如免疫治疗药物和/或抗生素和/或抗病毒药组合使用。

[0069] 本发明的疫苗组合物包含PD-L1或其免疫原性活性肽片段,用于治疗有需求的个体中的临床病症。优选地,所述PD-L1是该个体的物种的PD-L1。因而,如果有需求的个体是特定种类的哺乳动物,则所述PD-L1优选地是所述特定种类哺乳动物的PD-L1。在本发明的一个优选实施方案中,疫苗组合物包含SEQ ID N0:1的人PD-L1或其免疫原性活性肽片段。野生型人PD-L1,即天然存在的非突变形式的多肽,被确定为SEQ ID N0:1。

[0070] 然而,在本发明的某些实施方案中,本发明的疫苗组合物包含如下文定义的PD-L1的功能同源物或其免疫原性活性肽片段。

[0071] 本发明因此涉及疫苗组合物,其包含佐剂和:

[0072] i) SEQ ID N0:1的PD-L1;或

[0073] ii) SEQ ID N0:1的PD-L1的免疫原性活性肽片段;或

[0074] iii) 与之相同至少70%的SEQ ID N0:1的PD-L1的功能同源物;或

[0075] iv) 与之相同至少70%的SEQ ID N0:1的PD-L1的功能同源物的免疫原

[0076] 性活性肽片段,其中所述免疫原性活性肽片段是SEQ ID N0:1的PD-L1

[0077] 的免疫原性活性肽片段,其中已经置换最多三个氨基酸,或

[0078] v) 编码i)至iv)中任一者的核酸。

[0079] 术语“肽片段”在本文中用来定义任何非全长(与SEQ ID N0:1相比)的一串氨基酸残基,所述氨基酸残基直接源自SEQ ID N0:1的连续氨基酸串或据此合成。

[0080] 功能同源物可以定义为全长PD-L1或其片段,其在序列方面不同于野生型PD-L1,如SEQ ID N0:1的野生型人PD-L1,但是仍能够诱导针对表达PD-L1的细胞如癌细胞和DC的免疫反应。这些细胞中表达的PD-L1可以是野生型或内源突变(如先天性突变体或在细胞分裂期间或其他情况下诱导的突变)。功能同源物可以是野生型PD-L1的突变形式或可变剪接变体。在另一个方面,如下文描述那样定义PD-L1的功能同源物。功能同源物可以是,但不限于,全长或片段化PD-L1的具有离体引入的一个或多个突变和/或一个或多个序列缺失和/或添加的重组形式。

[0081] PD-L1的功能同源物可以是任何蛋白质/多肽,其与SEQ ID N0:1显示出至少一些序列同一性并且具有诱导针对表达PD-L1的细胞的免疫反应的能力。

[0082] 因此,本发明的PD-L1的功能同源物优选地与SEQ ID N0:1的PD-L1具有至少70%序列同一性,并且因此,功能同源物优选地与SEQ ID N0:1的人PD-L1的序列具有至少75%序列同一性,例如至少80%序列同一性,如至少85%序列同一性,例如至少90%序列同一性,如至少91%序列同一性,例如至少91%序列同一性,如至少92%序列同一性,例如至少93%序列同一性,如至少94%序列同一性,例如至少95%序列同一性,如至少96%序列同一性,例如至少97%序列同一性,如至少98%序列同一性,例如99%序列同一性,并且具有诱导针对表达PD-L1的细胞的免疫反应的能力。

[0083] 本发明的序列同一性在整个参考序列范围内确定并且因此与SEQ ID NO:1的序列同一性是在SEQ ID NO:1的整个长度范围内确定的。可以使用许多熟知算法并采用许多不同空位罚分计算序列同一性。相对于全长SEQ ID NO:1计算序列同一性。任何序列比对工具,如但不限于FASTA、BLAST或LALIGN,都可以用于检索同源物并且计算序列同一性。另外,可以使用一系列空位开口和延伸罚分进行序列比对。例如,可以使用空位开口罚分处于5-12范围内,优选为8并且空位延伸罚分处于1-2范围内,优选为1的BLAST算法。

[0084] 功能等同物还可以包含正常情况下在人蛋白质中不出现的化学修饰,如遍在蛋白化、标记(例如,用放射性核素、各种酶等标记)、聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生)、或通过插入(或通过化学合成而置换)氨基酸(氨基酸)如鸟氨酸,然而优选功能等同物不含化学修饰。

[0085] 与SEQ ID NO:1的PD-L1相比对氨基酸残基序列所做出的任何变化优选地是保守性置换。本领域技术人员知道怎样做出并评估“保守性”氨基酸置换,借助所述保守性氨基酸置换将一个氨基酸置换为具有一种或多种共有化学和/或物理特征的另一个氨基酸。保守性氨基酸置换不太可能会影响蛋白质的功能性。氨基酸可以根据共有特征分组。保守性氨基酸置换是将预定氨基酸组内部的一种氨基酸替换为该组内的另一种氨基酸,其中预定组内部的氨基酸显示出相似或基本上相似的特征。

[0086] 本发明使用的PD-L1或其功能同源物的免疫原性活性肽片段可以具有任何所需的长度。在一个具体实施方案中,本发明的免疫原性活性肽片段由SEQ ID NO:1所确定的PD-L1或其功能同源物的50个或更少个氨基酸残基,例如最多45个氨基酸残基,如最多40个氨基酸残基,例如最多35个氨基酸残基,如最多30个氨基酸残基,例如最多25个氨基酸残基,如18至25个连续氨基酸组成;所述功能同源物是这样一种功能同源物,其中最多三个氨基酸已经替换,如两个氨基酸,如一个氨基酸已经替换为另一个氨基酸,优选地通过保守性替换。

[0087] 因此在另一个具体实施方案中,本发明的免疫原性活性肽片段由来自SEQ ID NO:1的PD-L1或其功能同源物的最多25个氨基酸残基,如最多24个氨基酸残基,如最多23个氨基酸残基,如最多22个氨基酸残基,如最多21个氨基酸残基,如最多20个氨基酸残基,例如最多19个氨基酸残基,如最多18个氨基酸残基,例如最多17个氨基酸残基,如最多16个氨基酸残基,例如最多15个氨基酸残基,如最多14个氨基酸残基,例如最多13个氨基酸残基,如最多12个氨基酸残基,例如最多11个氨基酸残基,如8至10个连续氨基酸组成;所述功能同源物是这样一种同源物,其中最多两个氨基酸(如一个氨基酸)已经被置换,优选地通过保守性替换。优选地,该肽包含来自SEQ ID NO:1的PD-L1的最多10个连续氨基酸残基,如来自如SEQ ID NO:1所确定的PD-L1或其功能同源物的9个连续氨基酸残基,如8个连续氨基酸残基,如7个连续氨基酸残基;所述功能同源物是这样一种功能同源物,其中最多两个氨基酸,如一个氨基酸已经置换为另一个氨基酸,优选地通过保守性替换。

[0088] 因此在一些实施方案中,本发明的免疫原性活性肽片段是九肽(包含9个氨基酸残基的肽)和一些十肽(包含10个残基)。

[0089] 在本发明的一个优选实施方案中,免疫原性活性肽片段包含从由表1中列出的肽组成的组中选出的肽,更优选地包含从由SEQ ID NO:2、12和15组成的组中选出的肽。优选地,所述免疫原性活性肽片段由最多25个氨基酸残基,如最多24个氨基酸残基,如最多23个氨基酸残基,如最多22个氨基酸残基,如最多21个氨基酸残基,如最多20个氨基酸残基,例

如最多19个氨基酸残基,如最多18个氨基酸残基,例如最多17个氨基酸残基,如最多16个氨基酸残基,例如最多15个氨基酸残基,如最多14个氨基酸残基,例如最多13个氨基酸残基,如最多12个氨基酸残基,例如最多11个氨基酸残基,如10个氨基酸,例如9个氨基酸组成,并且包含由表1中列出的肽组成的组中选出的肽序列,更优选地包含从由SEQ ID NO:2、12和15组成的组中选出的肽。

[0090] 在本发明的一个非常优选实施方案中,所述免疫原性活性肽片段选自由表1中列出的肽组成的组,并且更优选地选自由SEQ ID NO:2、12和15组成的组。

[0091] 表1

多肽名称	氨基酸序列	在 PD-L1 (SEQ ID NO:1)中的起始位置	SEQ ID NO:
PDL101	LLNAFTVT	15	SEQ ID NO: 2
PDL102	ILLCLGVAL	247	SEQ ID NO: 3
PDL103	ILGAILLCL	243	SEQ ID NO: 4
PDL104	ALQITDVKL	98	SEQ ID NO: 5
PDL105	KLFNVTSTL	189	SEQ ID NO: 6
PDL106	RLLKDQLSL	86	SEQ ID NO: 7
PDL107	QLSLGNAAAL	91	SEQ ID NO: 8
PDL108	KINQRILVV	136	SEQ ID NO: 9
PDL109	HLVILGAIL	240	SEQ ID NO: 10
PDL110	RINTTTNEI	198	SEQ ID NO: 11
PDL111	CLGVALTFI	250	SEQ ID NO: 12
PDL112	QLDLAALIV	47	SEQ ID NO: 13
PDL113	SLGNAAALQI	93	SEQ ID NO: 14
PDL114	VILGAILLCL	242	SEQ ID NO: 15
PDL115	HTAELVPIEL	220	SEQ ID NO: 16
PDL116	FIFMTYWHL	7	SEQ ID NO: 17
PDL117	VIWTSSDHQV	165	SEQ ID NO: 18

[0094] 本发明的其他免疫原性活性肽片段包含SEQ ID NO:1的PD-L1的4至120、优选地8至100、更优选地10至75、然而更优选地12至60、甚至更优选地15至40、如18至25连续氨基酸(或更优选地由其组成),其中与PD-L1的序列SEQ ID NO:1相比,最多三个氨基酸已经被替换、缺失或添加,如两个氨基酸已经被替换、缺失或添加,或一个氨基酸已经被替换、缺失或添加。

[0095] 因此,在本发明的一个实施方案中,疫苗组合物包含免疫原性活性肽片段,所述免疫原性活性肽片段由SEQ ID NO:1的PD-L1的8至50个氨基酸、优选地8至10个或20至25个氨基酸的连续序列组成,其中已经置换最多三个氨基酸,并且其中所述置换优选地是保守的。

[0096] MHC

[0097] 存在两个类型的MHC分子:MHC I类分子和MHC II类分子。MHC I类分子由作为适应性免疫反应的主要效应细胞的CD8T细胞识别。MHC II类分子主要在抗原呈递细胞(APC)的表面上表达,其中最重要的抗原呈递细胞似乎是树突细胞。APC刺激原初T细胞以及免疫系统中的其他细胞。它们刺激CD8T细胞和CD4T细胞。

[0098] 在一个实施方案中,提供了由来自SEQ ID N0:1的PD-L1或其功能同源物的8-10个氨基酸组成的新的MHC I类限制性肽片段,其中SEQ ID N0:1的最多两个氨基酸已经被置换,所述肽片段的特征在于具有几种特征中的至少之一,所述几种特征之一是与I类HLA分子结合的能力,其中所述肽片段的亲和力受限于I类HLA分子,所述亲和力通过本文描述的装配结合测定法计算为能够回收半数最大I类HLA分子的肽的量(C_{50} 值),所述最多是50 μ M。这种装配测定法基于将肽加载至肽转运蛋白缺陷型细胞系T2后HLA分子的稳定作用。随后,使用构象依赖性抗体免疫沉淀正确折叠的稳定HLA重链并且量化肽结合作用。这个实施方案的肽包含SEQ ID N0:1的PD-L1或其功能同源物的最多200个、优选地最多100个、更优选地最多50个、然而更优选地最多25个、甚至更优选地最多20个、然而甚至更优选地最多15个,如最多10个连续氨基酸,例如8至10个连续氨基酸,其中SEQ ID N0:1的最多两个氨基酸已经被置换。

[0099] 这种测定法提供了根据以上述亲和力与给定HLA等位基因分子结合的能力筛选候选肽的简单手段。在优选的实施方案中,本发明的肽片段是这样一种肽片段,其具有最多30 μ M的 C_{50} 值,如最多20 μ M的 C_{50} 值,包括最多10 μ M、最多5 μ M和最多2 μ M的 C_{50} 值。

[0100] 在另一个优选实施方案中,本发明提供SEQ ID N0:1的PD-L1或其功能同源物的新的MHC II类限制性肽片段(在本文中也称作“肽”),其中SEQ ID N0:1的最多两个氨基酸已经被置换,所述肽片段的特征是具有下文描述的几种特征中至少一者。这个实施方案的肽包含SEQ ID N0:1的PD-L1或其功能同源物的4至120、优选地8至100、更优选地10至75、然而更优选地12至60、甚至更优选地15至40,如18至25个连续氨基酸(或更优选地由其组成),其中SEQ ID N0:1的最多两个氨基酸已经被置换。

[0101] 本发明因而提供了SEQ ID N0:1的PD-L1或其功能同源物的8-10个氨基酸的新MHC I类限制性肽片段或18-25个氨基酸的新MHC II类限制性肽片段,其中SEQ ID N0:1的最多两个氨基酸已经被置换,所述肽片段的特征是具有下文描述的几种特征中至少一者,所述几种特征之一是与受限的I类或II类HLA分子结合的能力。

[0102] 在具体的实施方案中,提供了肽片段,其为具有以下至少一个特征的MHC I类限制性肽或MHC II类限制性肽:

[0103] (i) 根据ELISPOT测定法的测定,能够在癌症患者的PBMC群体中以至少20/10⁵个PBMC的频率激发产生INF- γ 的细胞,和/或

[0104] (ii) 能够在肿瘤组织中原位检测与表位肽反应的CTL。

[0105] (iii) 能够在体外诱导PD-L1特异性T细胞生长。

[0106] 更优选地,本发明的肽是能够产生通过ELISPOT测定法(例如下文实施例1中描述的ELISPOT测定法)所测定的特异性T细胞反应的肽。根据ELISPOT测定,一些肽虽然不以高亲和力结合MHC I类或I I类,但仍可能产生T细胞反应。根据ELISPOT测定,能够以高亲和力结合MHC I类或I I类的其他肽也产生T细胞反应。两种肽均是本发明的优选肽。

[0107] 因此,本发明的优选肽是能够产生通过ELISPOT测定法所测量的特异性T细胞反应的肽,其中测量到多于20个肽特异性点每10⁸个细胞、更优选地每10⁷个细胞、甚至更优选地每10⁶个细胞、然而更优选地每10⁵个细胞。具体而言,本发明的优选肽是在通过实施例1中描述的ELISPOT测定法测量(包括体外用肽刺激)时,能够产生多于20个肽特异性点每10⁸个PBMC、更优选地每10⁷个PBMC、甚至更优选地每10⁶个PBMC、然而更优选地每10⁵个PBMC的特异

性T细胞反应的肽。

[0108] 本发明的最优选肽是能够在患有以PD-L1表达为特征的临床病症的个体中激发细胞免疫反应、优选地T细胞反应的肽，所述临床病症优选地是癌症、自身免疫性疾病或传染病，并且最优先地是癌症。

[0109] 如上文描述，HLA系统代表人主要组织相容性(MHC)系统。通常，MHC系统控制一些特征：移植抗原、胸腺依赖性免疫反应、某些补体因子和某些疾病的诱因。更具体地，MHC编码三种不同类型的分子，即I类、II类和III类分子，这些分子决定更一般的MHC特征。这些分子中，I类分子是呈递在大部分有核细胞和血小板表面上的称为HLA-A、HLA-B和HLA-C的分子。

[0110] 本发明的肽的特征在于它们与特定MHC I类HLA分子(受其限制)结合的能力。因此，在一个实施方案中，该肽是受MHC I类HLA-A分子限制的一种肽，所述MHC I类HLA-A分子包括HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A9、HLA-A10、HLA-A11、HLA-Aw19、HLA-A23(9)、HLA-A24(9)、HLA-A25(10)、HLA-A26(10)、HLA-A28、HLA-A29(w19)、HLA-A30(w19)、HLA-A31(w19)、HLA-A32(w19)、HLA-Aw33(w19)、HLA-Aw34(10)、HLA-Aw36、HLA-Aw43、HLA-Aw66(10)、HLA-Aw68(28)、HLA-A69(28)。在本文各处还使用更简单的名称，其中仅使用主要编号名称，例如HLA-A19或HLA-A24分别替代HLA-Aw19和HLA-A24(49)。在具体的实施方案中，本发明的肽受选自HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11和HLA-A24的MHC I类HLA分子限制。在具体的实施方案中，本发明的肽受MHC I类HLA分子HLA-A2或HLA-A3限制。

[0111] 在其他的有用实施方案中，本发明的肽受包括以下任一种的MHC I类HLA-B分子限制：HLA-B5、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B12、HLA-B13、HLA-B14、HLA-B15、HLA-B16、HLA-B17、HLA-B18、HLA-B21、HLA-Bw22、HLA-B27、HLA-B35、HLA-B37、HLA-B38、HLA-B39、HLA-B40、HLA-Bw41、HLA-Bw42、HLA-B44、HLA-B45、HLA-Bw46和HLA-Bw47。在本发明的具体实施方案中，本发明肽能够与之结合的MHC I类HLA-B分子选自HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27和HLA-B51。

[0112] 在其他的有用实施方案中，本发明的肽受包括但不限于以下任一种的MHC I类HLA-C分子限制：HLA-Cw1、HLA-Cw2、HLA-Cw3、HLA-Cw4、HLA-Cw5、HLA-Cw6、HLA-Cw7和HLA-Cw1。

[0113] 在其他的有用实施方案中，本发明的肽受包括但不限于以下任一种的MHC II类HLA分子限制：HLA-DPA-1、HLA-DPB-1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、HLA-DRB和这些组中的全部等位基因及HLA-DM、HLA-DO。

[0114] 可以通过与结合给出的特定HLA分子的已知序列进行比对从而揭示肽中特定位置处一些相关氨基酸的优势，来选择可能具有与特定HLA分子结合的能力的肽。这种优势氨基酸残基在本文中也称作“锚定残基”或“锚定残基基序”。通过遵循这种基于能够从可访问数据库中获得的已知序列数据的相对简单的程序，可以从PD-L1衍生可能与特定HLA分子结合的肽。下表中给出这类针对一系列HLA分子分析的代表性例子：

[0115] 表2

HLA 等位基因	位置 1	位置 2	位置 3	位置 5	位置 6	位置 7	C 端
[0116]	HLA-A1	T、 S	D、 E		L	Y	
	HLA-A2	L、 M		V		L、 V	
	HLA-A3	L、 V、 M	F、 Y			K、 Y、 F	
	HLA-A11	V、 I、 F、 Y	M、 L、 F、 Y、			K、 R	
[0117]	HLA-A23	I、 Y	I			W、 I	
	HLA-A24	Y		I、 V	F	I、 L、 F	
	HLA-A25	M、 A、 T	I			W	
	HLA-A26	E、 D	V、 T、 I、 L、 F		I、 L、 V	Y、 F	
	HLA-A28	E、 D	V、 A、 L			A、 R	
	HLA-A29	E	E			Y、 L	
	HLA-A30		Y、 L、 F、 V			Y	
	HLA-A31			L、 M、 F、 Y		R	
	HLA-A32		I、 L			W	
	HLA-A33		Y、 I、 L、 V			R	
	HLA-A34		V、 L			R	
	HLA-A66	E、 D	T、 V			R、 K	
	HLA-A68	E、 D	T、 V			R、 K	
	HLA-A69		V、 T、 A			V、 L	
	HLA-A74		T			V、 L	
	HLA-B5		A、 P	F、 Y		I、 L	
	HLA-B7	*	P			L、 F	
	HLA-B8			K	K、 R	L	
	HLA-B14		R、 K			L、 V	
	HLA-B15 (B62)		Q、 L、 K、 P、 H、 V、 I、 M、 S、 T			F、 Y、 W	
	HLA-B17					L、 V	
	HLA-B27		R			Y、 K、	
	HLA-B35		P			F、 L	
	HLA-B37		D、 E			I、 L、 M、	
	HLA-B38		H	D、 E		Y	
						I、 L、 M	
						F、 L	

[0118]	HLA-B39	R、 H	F、 I、 V		L、 F
	HLA-B40 (B60,61)	E			L、 V、 A、 W、 M、 T、 R
	HLA-B42	L、 P			Y、 L
	HLA-B44	E			F、 Y、 W
	HLA-B46	M、 I、 L、 V			Y、 F
	HLA-B48	Q、 K			L
	HLA-B51	A、 P、 G			F、 Y、 I、 V
	HLA-B52	Q	F、 Y		I、 V
	HLA-B53	P			W、 F、 L
	HLA-B54	P			
	HLA-B55	P			A、 V
	HLA-B56	P			A、 V
	HLA-B57	A、 T、 S			F、 W、 Y
	HLA-B58	A、 T、 S			F、 W、 Y
	HLA-B67	P			L
	HLA-B73	R			P
	HLA-Cw1	A、 L			L
	HLA-Cw2	A、 L			F、 Y
	HLA-Cw3	A、 L			L、 M
	HLA-Cw4	Y、 P、 F			L、 M、 F、 Y
	HLA-Cw6				L、 I、 V、 Y
	HLA-Cw6	Y			L、 Y、 F
	HLA-Cw8	Y			L、 I、
	HLA-Cw16	A、 L			L、 V

[0119] *在一个实施方案中,在这个位置不存在特定锚定残基,然而在优选的实施方案中锚定残基是R或A。

[0120] 因而,作为例子,可能具有与HLA-A3结合的能力的九肽具有以下一种序列:Xaa-L-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K,Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Y,Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-F或Xaa-V-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K(Xaa表示任何氨基酸残基)。以相似方式,可以设计出可能具有与任何其他HLA分子结合的能力的序列。可以理解,本领域普通技术人员能够针对给定HLA分子鉴定出其他“锚定残基基序”。

[0121] 本发明的肽可以具有以下序列,所述序列是SEQ ID N0:1的PD-L1的天然序列的连续序列。然而,通过置换、缺失或添加至少一个氨基酸残基修饰这种天然序列,可以从所述天然序列衍生出对任何给定HLA分子具有更高亲和力的肽,由此鉴定出给定HLA分子的锚定残基基序。

[0122] 因而,在有用的实施方案中的,本发明的多肽包括这样的肽,其中对于表中列出的每个特定HLA等位基因,所述肽的序列包含如表中所示的任意氨基酸残基。

[0123] 因而,本发明的肽可以是包含来自PD-L1的连续序列的前文提到的任一种肽,其中1至10个、优选地1至5个、更优选地1至3个、甚至更优选地1至2个、然而更优选地1个氨基酸已经替换为另一种氨基酸,优选地以所述替换方式使得该肽包含如上表2中所示的给定HLA-A特异性肽的一个或多个,优选地全部锚定残基。

[0124] 优选HLA分子的例子(本发明的优选肽受限于其)包括选自HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11和HLA-A24的MHC I类HLA分子,更优选地,该肽受HLA-A3或HLA-A2限制。或者,优选的HLA分子包括选自HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27和HLA-B51的MHC I类HLA-B分子。

[0125] 鉴定本发明多肽的一个方法包括以下步骤:选择特定HLA分子,例如一种在给定群体中以高比率出现的分子,实施上文所述的比对分析以鉴定PD-L1蛋白中的“锚定残基基序”,分离或构建大小合适的肽,所述肽包含一个或多个已鉴定的锚定残基,并且检验所产生的肽在癌症患者的PBMC群体中以频率至少 $20/10^5$ 个PBMC激发产生INF- γ 的细胞的能力,所述能力通过如实施例1中所述的ELISPOT测定法(包括在体外用肽刺激一次)测定。

[0126] 在本发明的一个方面,提供长于8至10个氨基酸残基的PD-L1-衍生肽。用蛋白酶体将长于8至10个氨基酸的多肽加工成较短长度以便与HLA分子结合。因而,当施用长度超过8至10个氨基酸残基的多肽时,PD-L1的“长”多肽/蛋白质/蛋白质片段/变体在细胞溶胶中由蛋白酶体加工成一系列较小的肽。使用可以由蛋白酶体加工成多种不同较短肽的较长多肽的优点在于,与受限于特定HLA类型的8至10个氨基酸特定肽相比,可以用一种肽靶向更多的HLA类型。

[0127] 令人惊讶地,本发明的一些肽与MHC分子结合的亲和力的高度足以实现不必要的置换,且所述肽在此呈递时可用作抗原。优选地,本发明的疫苗组合物包含以下一种或多种:PD-L1全长多肽(SEQ ID NO:1),来自SEQ ID NO:1的全长PD-L1的多肽片段、其功能同源物和PD-L1的免疫原性活性肽片段,其中已经置换、添加或缺失一个或两个氨基酸。更优选地,疫苗组合物包含在本公开的序列表中列出的任意序列。非常优选地,疫苗组合物包含肽PDL101(SEQ ID NO:2)、PDL111(SEQ ID NO:12)和/或PDL114(SEQ ID NO:15)。

[0128] 本发明肽的显著特征是其识别或激发产生INF- γ 的响应T细胞的能力,所述响应T细胞即特异性识别PBMC群体中、患有癌症和/或感染的个体的APC或肿瘤/瘤性细胞(靶细胞)上特定肽的细胞毒性T细胞(CTL)。通过使来自个体的PBMC、APC或肿瘤细胞进行ELISPOT测定,可以容易的测定这种活性。在测定之前,通过使待验定的细胞与待测试的肽接触而刺激这些细胞,这可能是有利的。优选地,根据本文所用的ELISPOT测定法的测定,所述肽能够以至少 $20/10^5$ 个PBMC的频率激发或识别产生INF- γ 的T细胞。更优选地,该频率是至少 $30/10^5$ 个PBMC。

[0129] ELISPOT测定法代表监测PD-L1特异性T细胞应答的强大工具。本文研究结果的一个主要意义在于,本发明的肽表达于癌细胞上和/或表达PD-L1的APC细胞上并且与其上的HLA分子复合。这使得这些癌细胞易遭CTL破坏并且强调了PD-L1免疫对抗癌症和感染的潜在作用。来自肾细胞癌患者、黑色素瘤患者和乳腺癌患者的PBMC中存在针对HLA限制性PD-L1衍生肽表位的自发性CTL反应证明了PD-L1免疫原性肽的免疫治疗潜力。

[0130] 在本发明的一个实施方案中,本发明的免疫原性活性肽片段能够诱导能杀死表达PD-L1的细胞(如表达PD-L1的癌细胞)的PD-L1特异性T-细胞。特别优选的是,所述肽片段能够在如下文实施例1和2中所述体外共温育后诱导能够溶解至少10%癌细胞(如MDA-MB231细胞)的PD-L1特异性T细胞。

[0131] 来源

[0132] 从中可以衍生所述肽的蛋白质可以是来自表达该蛋白质的任意动物物种的任何PD-L1多肽。在优选的实施方案中,起始蛋白质来自哺乳动物物种,包括啮齿类物种、兔和灵长类物种如人类。基于所选择蛋白质的序列,通过对蛋白质起始物质的任何适宜化学或酶促处理而产生上文所示合适大小的肽,来衍生本发明的肽,或本发明的肽可以通过本领域普通技术人员熟悉的任何常规肽合成方法合成。最优选地,PD-L1多肽是人PD-L1并且更优选地是SEQ ID NO:1的人PD-L1。

[0133] 个体

[0134] 待用本发明疫苗组合物治疗的个体是患有临床病症的患者。该个体优选地是哺乳动物物种并且最优选地是人类。该个体可以是任何年龄,年轻或年老,并且可以是雄性或雌性。该个体患有的临床病症可以是瘤性疾病如癌症,或传染病如胞内感染或病毒性感染或者自身免疫性疾病。

[0135] 本发明的一个实施方案提供用于治疗癌症、降低癌症风险、稳定或预防癌症的疫苗。在另一个实施方案中,本发明提供用于治疗源自感染(如胞内感染或病毒性感染)的疾病、降低该疾病风险、稳定或预防该疾病的疫苗。在又一个实施方案中,本发明提供用于治疗自身免疫性疾病、降低自身免疫性疾病风险、稳定或预防自身免疫性疾病的疫苗组合物。

[0136] 癌症

[0137] 本发明的疫苗组合物可以用来预防临床病症、降低该临床病症的风险或治疗该临床病症。优选地,该临床病症与PD-L1表达相关或以其为特征。PD-L1可以是SEQ ID NO:1中所确定的PD-L1或与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的同源物。因而理解,PD-L1的表达水平(该表达是hnRNA、mRNA、前体蛋白、完全加工的蛋白质等的表达)等于或高于不患有所述临床病症的个体中的表达水平。

[0138] 在本发明的一个优选实施方案中,所述临床病症是癌症。癌症(恶性肿瘤)是一类疾病,其中一组细胞显示失控生长(生长和分裂超出正常限制)、侵入(侵扰并破坏相邻组织)和有时转移(借助淋巴液或血液扩散至体内其他位置)的性状。癌症的这三类恶性特性使其区别于良性肿瘤,后者是受自身限制、不侵入或不转移。大部分癌症形成肿瘤,但是一些癌症如白血病不形成肿瘤。如本文所用的术语“癌症”意在涵盖任何癌症、瘤性疾病和前瘤性疾病。

[0139] 作为可以通过施用本发明疫苗进行治疗、管理和/或预防的癌症的例子所给出的癌症的非限制性组包括:结肠癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing's肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌(cystadenocarcinoma)、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质母细胞瘤、神经瘤、craniopharingioma、神经鞘

瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤 (craniopharyngioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病和淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病和急性髓系真性红细胞增多症、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和重链病、急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、直肠癌、泌尿癌、子宫癌、口腔癌、皮肤癌、胃癌、脑肿瘤、肝癌、喉癌、食管癌、乳腺癌、儿童-无标记 (childhood-null) 急性淋巴样白血病 (ALL)、胸腺性ALL、B-细胞ALL、急性髓样白血病、骨髓单细胞样白血病、急性巨核细胞样白血病、Burkitt淋巴瘤、急性髓样白血病、慢性髓样白血病和T细胞白血病、小的和大的非小细胞肺癌 (small and large non-small cell lung carcinoma)、急性粒细胞白血病、生殖细胞肿瘤、子宫内膜癌、胃癌、头颈癌、慢性淋巴样白血病、多毛细胞白血病和甲状腺癌。

[0140] 在一个优选实施方案中,本发明的疫苗组合物能够在受试者中激发临床反应,其中所述临床反应可以以病情稳定为特征,在优选的实施方案中,该临床反应可以部分反应为特征或优选地,该临床反应可以以癌症完全缓解为特征。优选地,癌症选自:黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、血液学癌(如白血病)、结肠和肾细胞癌,更优选地选自黑色素瘤、肾细胞癌和乳腺癌。

[0141] 在本发明的一个方面,该疫苗组合物能够在个体中激发临床反应。在一个实施方案中,该临床反应可以以病情稳定(没有进一步加重或进展)为特征,在优选的实施方案中,该临床反应可以以部分反应为特征或优选地,该临床反应可以以癌症或感染的完全缓解为特征。可以如下文所述确定临床反应。

[0142] 在本发明的另一个方面,疫苗组合物能够在受试者中激发临床反应,其中所述临床反应以最大靶病灶的最长直径之和减小为特征。可以如下文所述确定该减小。

[0143] 代表所涉及全部器官的高达5个病灶/器官的全部可测量病灶和总计10个病灶应当被鉴定为靶病灶并在基线处记录和测量。

[0144] • 应当基于靶病灶的大小(具有最长直径的病灶)及它们对精确反复测量(通过成像技术或临床测量)的适用性选择靶病灶。

[0145] • 将计算全部靶病灶的最长直径(LD)的总和并且表示为基线总和LD。将使用基线总和LD作为借以表征目标肿瘤的参考。

[0146] • 全部其他病灶(或疾病部位)应当被鉴定为非靶病灶并也应当在基线时记录。不要求测量这些病灶,但是在整个随访期间应当注意这些病灶中每种病灶的存在或不存在。

[0147] 靶病灶的评估

[0148] • 完全反应(CR):全部靶病灶消失

[0149] • 部分反应(PR):以基线总和LD作为参考,靶病灶的LD总和下降至少30%。

[0150] • 病情进展(PD):自治疗开始或出现一种或多种新病灶,以所记录的最小总和LD作为参考,靶病灶的LD总和增加至少20%。

[0151] • 病情稳定(SD):从治疗开始,以最小总和LD作为参考,既没有足以定性PR的缩小,也没有足以定性PD的增加

[0152] 非靶病灶的评价

[0153] • 完全反应(CR):全部非靶病灶的消失和肿瘤标记水平的归一化

[0154] • 不完全反应/病情稳定(SD):一种或多种非靶病灶的持续或/和维持肿瘤标记水

平高于正常限。

[0155] • 病情进展 (PD) : 出现一个或多个新病灶和/或现有非靶病灶发生明确进展

[0156] 在本发明的一个实施方案中,包含本文中提到的任意蛋白质和/或多肽的疫苗组合物能够在受试者中激发临床反应,其中所述临床反应以最大靶病灶的最长直径之和减小为特征。

[0157] 本发明的疫苗组合物能够激发针对癌的免疫反应,所述癌表达SEQ ID NO:1的PD-L1或其与SEQ PD-L1具有至少70%同一性的功能同源物。本发明的疫苗组合物能够在接种个体中激发产生针对癌细胞、表达PD-L1的APC的具有细胞毒效应的效应T细胞和/或在受试者中诱导抗原特异性T细胞在肿瘤基质中浸润。

[0158] 除它们在PBMC群体中激发免疫反应的能力之,本发明的肽还能够原位即在实体瘤组织中激发溶细胞免疫反应。这可以例如通过以下方式证明:提供HLA-肽复合物(例如为多聚化并配有可能检测标记物)并使用这类复合物用于免疫组织化学染色以在肿瘤组织中检测与本发明的免疫原性活性肽片段反应的CTL。因此,本发明肽的又一个显著特征是它能够在肿瘤组织中原位检测与表位肽反应的CTL。

[0159] 除它们与HLA分子结合以导致HLA和肽的复合物(所述复合物转而充当用于溶细胞性T细胞的表位或靶)在细胞表面上呈递的能力之外,本发明的肽还可以激发其他类型的免疫反应,如导致产生针对所述复合物的抗体的B-细胞反应和/或迟发型超敏反应(DTH)。将后一类型的免疫反应定义为在本发明肽的注射部位处发红和可触及的硬结。

[0160] 本发明的目的是提供一种用于预防癌症、降低癌症的风险或治疗癌症的疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:1的PD-L1或其与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的功能同源物或包含所述PD-L1或其所述功能同源物的连续序列的免疫原性活性肽片段或编码所述PD-L1或所述肽片段的核酸;和佐剂。

[0161] 癌症组合疗法

[0162] 在本发明的实施方案中,其中本发明涉及用于治疗癌症的包含PD-L1或其免疫原性活性肽片段的疫苗组合物,在一些情况下可以恰当的将本发明疫苗组合物与其他常规癌症疗法组合治疗,所述常规癌症疗法是如化疗、放疗法、用免疫刺激物质治疗、基因治疗、用抗体治疗和使用树突细胞治疗。

[0163] 由于肿瘤细胞中升高的PD-L1表达导致免疫系统受到抑制,所以如本发明所公开的基于PD-L1的免疫疗法与细胞毒性化疗和/或另一种抗癌免疫治疗疗法的组合是一种治疗癌症的有效方案。这些治疗在本文中也称作“第二活性成分”。

[0164] 与本发明疫苗组合物一起(依次或同时)施用而言有意义的化疗药的例子包括但不限于:全反视黄酸、辅酶B12(Actimide)、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、佐柔比星、多西紫杉醇、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、依立替康、来那度胺、甲酰四氢叶酸、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、雷利米得(Revlimid)、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星(valrubicin)、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。在一个实施方案中,与本发明药剂组合使用的化疗药本身可以是不同化疗药的组合。合适的组合包括FOLFOX和IFL。FOLFOX是包括5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸和奥沙利铂的组合。IFL治疗包括依立替康、5-FU和甲酰四氢叶酸。

[0165] 另一个第二活性成分可以是激酶抑制剂,用于治疗肿瘤时独立、同时或合并使用。合适的激酶抑制剂包括已经显示拥有抗肿瘤活性(如吉非替尼(易瑞沙(Iressa))和厄洛替尼(特罗凯(Tarceva))的那些,并且这些激酶抑制剂可以与所述肽组合使用。受体酪氨酸激酶抑制剂,如已经显示有效治疗肾细胞癌的苹果酸舒尼替尼(sunitinib malate)和索拉替尼(sorafenib),也适合作为第二活性成分使用。

[0166] 第二活性成分的其他例子是免疫刺激物质例如细胞因子和抗体。如细胞因子可以选自,但不限于:GM-CSF、I型IFN、白介素21、白介素2、白介素12和白介素15。抗体优选地是免疫刺激性抗体如抗-CD40或抗CTLA-4抗体。免疫刺激性物质也可以是能够耗尽免疫抑制性细胞(例如调节性T细胞)或因子的物质,所述物质可以例如是E3遍在蛋白连接酶。E3遍在蛋白连接酶(HECT、RING和U框蛋白)已经作为免疫细胞功能的关键分子调节物出现,并且每种酶都可以在感染期间通过靶向特定抑制性分子进行蛋白酶解破坏而参与调节免疫反应。几种HECT和RING E3蛋白现在还与免疫自我耐受性的诱导和维持有关:c-Cbl、Cbl-b、GRAIL、Itch和Nedd4各自负向调节T细胞生长因子的产生和增殖。

[0167] 在一个实施方案中,包含PD-L1、其上文所述的任意功能同源物或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段的本发明疫苗组合物与第二活性成分如免疫刺激性物质组合施用。免疫刺激性物质优选地是白介素如IL-21或IL-2或化疗药。

[0168] 传染病和自身免疫疾病

[0169] 本发明还涉及用于治疗临床病症的包含PD-L1或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段的疫苗组合物,其中所述临床病症可以是感染或所述临床病症可以是自身免疫性疾病。

[0170] 本文所用的词“感染”指产生免疫反应(如炎症)的任何种类的临床病症,并且因此包括传染病、慢性感染、自身免疫病症和变应性炎症。因而,感染,如传染病、慢性感染、自身免疫病症和变应性炎症均是与本发明有关的临床病症,并且在下文有涉及。

[0171] 具体而言,感染或自身免疫性疾病可以是与炎症相关的疾病。炎症是血管组织对有害刺激,如病原体、受损细胞或刺激物的复杂生物学反应。它是生物除去有害刺激以及启动组织愈合过程的保护性尝试。炎症可以划归为急性或慢性。急性炎症是身体对有害刺激的初始反应并且通过增加血浆和白细胞从血液移动至受伤组织而实现。一连串生物化学事件传递炎症反应并使其成熟,所述炎症反应包括局部血管系统、免疫系统和受伤组织内部的各种细胞。延长的炎症,也称作慢性炎症,导致炎症部位处存在的细胞类型的进行性变动并且以同时存在组织破坏和从炎症过程愈合为特征。在任何一种情况下,PD-L1均由免疫系统细胞如APC表达,并且因此感染和炎症是可以通施用本发明的疫苗组合物进行治疗、预防或可以降低其的风险的临床病症。所述疫苗组合物优选地包含PD-L1或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段。

[0172] 与本发明有关的与炎症相关病症的例子包括但不限于:变应性炎症、哮喘、自身免疫疾病、慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、超敏性、传染病、炎性肠病、盆腔炎性疾病、再灌注损伤、类风湿性关节炎、移植排斥和血管炎。

[0173] 慢性感染和炎症

[0174] 在本发明的一个实施方案中,临床病症是慢性炎症。具体而言,待用本发明疫苗组合物治疗的自身免疫性疾病可以是慢性炎症。慢性炎症是以活跃的炎症、组织破坏和修复

尝试共存为特征的病理状况。慢性发炎的组织以单核免疫细胞(单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞)浸润、组织破坏和愈合尝试(这包括血管生成和纤维化)为特征。

[0175] 在急性炎症中,去除刺激使单核细胞(其在适宜的活化下变成巨噬细胞)向发炎组织中的募集停止,并且现存的巨噬细胞通过淋巴管离开该组织。然而在慢性发炎的组织中,刺激持续存在,并且因此维持单核细胞的募集,现存的巨噬细胞原地滞留,并且巨噬细胞的增殖受到刺激(特别在动脉粥样化斑块中)。

[0176] 本发明的目的是提供一种用于预防自身免疫性疾病、降低自身免疫性疾病的风险或治疗自身免疫性疾病(例如治疗慢性炎症)的疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:1的PD-L1或其与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的功能同源物或包含所述PD-L1或所述功能同源物的连续序列的免疫原性活性肽片段(例如上文所述的任意免疫原性活性肽片段)或编码所述PD-L1或所述肽片段的核酸;和佐剂。

[0177] 传染病

[0178] 本发明的疫苗组合物可以用来预防临床病症、降低该临床病症的风险或治疗该临床病症。在本发明的一个优选实施方案中,该临床病症是传染病。该传染病可以由能够在患有该传染病的个体中诱导PD-L1表达增加的任意感染介质如细菌、病毒、寄生虫和/或真菌引起,优选地,该传染病是慢性疾病或面临变成该慢性疾病的风险。因此本发明的一个方面是提供一种用于治疗由感染介质引起的疾病、改善该疾病(减轻其严重性)、稳定和/或预防该疾病的疫苗组合物,其包含PD-L1或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段。

[0179] 传染病可以由病毒引起,并且可以在治疗时针对其施用本发明疫苗组合物的病毒疾病包括但不限于以下病毒疾病:HIV、AIDS、AIDS相关综合征、鸡痘(Varicella)、普通感冒、巨细胞病毒感染、科罗拉多蜱传热、登革热、埃博拉出血热、手足口病、肝炎、单纯疱疹、带状疱疹、HPV(人乳头瘤病毒)、流感(Flu)、拉萨热、麻疹、马堡出血热、传染性单核细胞增多症、腮腺炎、诺如病毒、脊髓灰质炎、进行性多灶性脑白质病、狂犬病、风疹、SARS、天花(Variola)、病毒性脑炎、病毒胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒肺炎、西尼罗河病和黄热病。优选地,将疫苗组合物施用至患有HIV/AIDS或可能造成癌症的病毒性感染的个体。与人类癌症相关的主要病毒是人乳头瘤病毒、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒、Epstein-Barr病毒和人T淋巴细胞病毒;因此本发明的目的是作为治疗这些病毒性感染的疗法或部分疗法施用。更优选地,传染病可以是被选自HIV和肝炎病毒的病毒感染。

[0180] 与本发明有关的细菌性感染的例子包括但不限于:炭疽、细菌性脑膜炎、肉毒杆菌中毒、布氏杆菌病、弯曲杆菌病、猫抓病、霍乱、白喉毒素、流行性斑疹伤寒、淋病、脓疱病、军团病、麻风病(Hansen病)、钩端螺旋体病、李斯特氏菌病、莱姆病、类鼻疽、风湿热、MRSA感染、诺卡菌病、百日咳(Whooping Cough)、瘟疫(Plague)、肺炎球菌肺炎、鹦鹉热、Q发热、洛矶山斑疹热(RMSF)、沙门氏菌病、猩红热、志贺菌病、梅毒、破伤风、沙眼、结核病、土拉热、伤寒、斑疹伤寒和尿路感染。本发明的目的是提供一种用于治疗和/或预防细菌性感染和/或降低细菌性感染的风险的疫苗。

[0181] 本发明的又一个方面是提供一种用于治疗和/或预防以下疾病和/或降低以下疾病的风险的疫苗组合物:寄生虫性传染病如,但不限于:非洲锥虫病、阿米巴病、蛔虫病、巴贝斯虫病、南美锥虫病、肝吸虫病、隐孢子虫病、囊尾蚴病、裂头绦虫病、龙线虫病、包虫病、蛲虫病、肝片吸虫病、姜片虫病、丝虫病、自由生活阿米巴虫感染、贾第虫病、颚口线虫病、膜

壳绦虫病、等孢球虫病、黑热病、利什曼病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、蛲虫感染、疥癣、血吸虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形虫病、旋毛虫病(Trichinellosis)、毛线虫病(Trichinosis)、鞭虫病、滴虫病和锥虫病；真菌传染病如但不限于：曲霉菌病，芽生菌病(Blastomycosis)，念珠菌病，球孢菌病，隐球菌病，组织胞浆菌病，脚癣；朊病毒传染病如但不限于：传染性海绵状脑病，牛海绵状脑病，克-雅氏病，库鲁病-致死性家族性失眠症和阿尔珀斯综合征；因此本发明的目的是作为治疗这些寄生虫感染、真菌感染或朊病毒所致感染的疗法或部分疗法施用。

[0182] 1. 在一个优选实施方案中，本发明的疫苗组合物用于治疗传染病，所述传染病是胞内感染，优选地是选自单核增生李斯特菌(*L.monocytogenes*)和疟原虫属(*Plasmodium*)的病原体胞内感染。

[0183] 传染病组合疗法

[0184] 进一步提供，通过施用本发明疫苗组合物对任意传染病的治疗可以与其他(第二)活性成分一起以任何顺序依次或同时或与其他治疗如抗生素治疗、化疗、用免疫刺激物质治疗、使用树突细胞治疗、抗病毒药、抗寄生虫药等组合时给予。

[0185] 可以与本发明疫苗组合用于治疗传染病的第二活性成分的例子包括并且不限于抗生素。本文中的术语“抗生素”指具有抗细菌、抗真菌、抗病毒和/或抗寄生虫活性的物质；与本发明有关的例子包括但不限于：阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、巴龙霉素、链霉素、妥布霉素、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、氯霉素、氟喹诺酮、环丙沙星、加替沙星、吉米沙星、格帕沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、莫西沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星、曲伐沙星、糖肽、万古霉素、林可胺、克林霉素、大环内酯类/酮内酯类、阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素、红霉素、头孢羟氨苄、头孢唑林、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢匹林、头孢拉定、头孢克洛、头孢孟多、头孢尼西、头孢替坦、头孢西丁、头孢丙烯、头孢呋辛、氯碳头孢、头孢地尼、头孢托仑、头孢克肟、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢布烯、头孢唑肟、头孢曲松、头孢吡肟、单酰胺菌素、氨曲南、硝基咪唑类、甲硝唑、噁唑烷酮类、利奈唑胺、青霉素、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸盐、氨苄青霉素、舒巴克坦、巴氨西林、羧苄青霉素、氯唑西林、双氯西林、甲氧西林、美洛西林、萘夫西林、苯唑西林、青霉素G、青霉素V、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林、替卡西林/阿莫西林/克拉维酸盐、链阳菌素类、奎奴普丁、达福普汀、磺酰胺/磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、四环素、地美环素、多西环素、米诺环素、四环素、唑类抗真菌药类、克霉唑、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑、伏立康唑、两性霉素B、制霉菌素、棘球白素、卡泊芬净、米卡芬净、环吡酮、氟胞嘧啶、灰黄霉素和特比萘芬。其他有意义的是抗病毒药如阿糖腺苷、阿昔洛韦、更昔洛韦和万赛维(Valcyte)(缬更昔洛韦)、核苷类似物逆转录酶抑制剂(NRTI)：AZT(齐多夫定)、ddI(去羟肌苷)、ddC(扎西他滨)、d4T(司他夫定)、3TC(拉米夫定)、非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI)：奈韦拉平、地拉韦啶、蛋白酶抑制剂：沙奎那韦、利托那韦、茚地那韦、奈非那韦、利巴韦林、金刚烷胺/金刚乙胺、瑞乐沙和达菲、普来可那立、干扰素。

[0186] 在一个实施方案中，本发明涉及与至少一种抗生素组合用于治疗传染病的疫苗组合物，其包含SEQ ID NO:1的PD-L1，其上文所述的任意功能同源物或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段。优选地，本发明的疫苗组合物用于治疗慢性感染例如HIV并且因此与前文所列出的任一种抗生素如抗病毒药组合使用。

[0187] 自身免疫疾病

[0188] 当生物未能将其自身组成部分(下至亚分子水平)识别为自我而导致针对其自身细胞和组织的免疫反应时,产生自身免疫疾病。因这种异常免疫反应所致的任意疾病均称作自身免疫性疾病并且与本发明有关。

[0189] 本发明的目的是提供一种用于预防自身免疫疾病、降低自身免疫疾病的风险或治疗自身免疫疾病的疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:1的PD-L1或上文所述的其与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的功能同源物或PD-L1的任意免疫原性活性肽片段或编码所述PD-L1或所述肽片段的核酸;和佐剂。所述自身免疫疾病可以优选地选自乳糜泻、糖尿病类型1(IDDM)、系统性红斑狼疮(SLE)、**Sjögren**综合征、多发性硬化(MS)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、Graves病、特发性血小板减少性紫癜和类风湿性关节炎(RA)。优选地,自身免疫性疾病选自糖尿病、SLE和硬化。

[0190] 自身免疫性疾病组合疗法

[0191] 对自身免疫性疾病的当前治疗通常是免疫抑制药、抗炎药或缓解剂。非免疫疗法,如桥本氏甲状腺炎或糖尿病类型1治疗中的激素替代,导致自身侵入性反应(autoaggressive response)。饮食控制限制乳糜泻的严重性。甾体或NSAID疗法限制了许多疾病的炎性症状。静脉内免疫球蛋白制品(IVIG)用于慢性炎性脱髓鞘多发性神经病(CIDP)和Guillain-Barré综合征(GBS)。已经显示更特异的免疫调节疗法,如TNF α 拮抗药依那西普,可用于治疗RA。这些免疫疗法可能与增加的副作用风险(如感染易感性)相关。

[0192] 已经基于这些观察结果开发了虫疗法,该疗法包括用特定寄生虫性肠道线虫(蠕虫)接种个体。目前有两个密切相关的治疗可使用:用美洲钩虫(*Necator americanus*) (通称为钩虫)或猪鞭虫(*Trichuris suis* Ova) (通称为猪鞭虫卵)接种。已有的研究证明,这种方案高度有效的治疗多种自身免疫疾病,包括Crohn病、溃疡性结肠炎、哮喘、变态反应、多发性硬化和慢性炎性疾病。

[0193] 在一个实施方案中,本文中公开的疫苗与第二活性成分如前述提到的任一种药物和针对自身免疫疾病的治疗组合使用。

[0194] 变应性炎症

[0195] 过敏是免疫系统的紊乱,经常又称作特异反应性。过敏反应针对称作变应原的环境物质发生;这些反应是获得性的、可预测且快速的。严格地,过敏是4种形式超敏反应的一种并被称作I型(或速发型)超敏反应,其特征在于某些白细胞(称作肥大细胞和嗜碱性粒细胞)被称作IgE的抗体类型过度活化,导致极端炎症反应。常见的过敏反应包括湿疹、荨麻疹、干草热、哮喘、食物过敏和对叮咬昆虫(如胡蜂和蜜蜂)的毒液的反应。

[0196] 变应性炎症是几种失能(disabilities)或医学病症(包括过敏性哮喘、异位性皮炎、过敏性鼻炎和几种眼部过敏性疾病)的重要病理生理特征。

[0197] 本发明的目的是提供一种用于预防变应性炎症、降低变应性炎症的风险或治疗变应性炎症的疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:1的PD-L1或上文所述的其与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的功能同源物或PD-L1的任意免疫原性活性肽片段或编码所述PD-L1或所述肽片段的核酸;和佐剂。

[0198] 变应性炎症组合治疗

[0199] 两个类型的治疗可用于治疗变应性炎症:药物疗法和免疫疗法。

[0200] 药物疗法是使用拮抗性药物阻断变应性介导物的作用,或防止细胞活化和脱粒过程。这些药物包括抗组胺药、可的松、地塞米松、氢化可的松、肾上腺素(epinephrine, adrenaline)、茶碱、色甘酸钠和抗白三烯药类,如孟鲁司特(Singulair)或扎鲁司特(Accolate);抗胆碱能药类、解充血剂、肥大细胞稳定剂,并且还常使用认为损害嗜酸性粒细胞趋化的其他化合物。

[0201] 免疫疗法是其中用剂量渐进增大的所讨论变应原逐渐接种个体的脱敏或减敏治疗。第二形式的免疫疗法包括静脉内注射单克隆抗IgE抗体。第三类型,舌下免疫疗法,是口服施用疗法,它利用对非致病抗原如食品和宿居细菌的口服免疫耐受性优点。

[0202] 在一个实施方案中,本文中公开的疫苗与第二活性成分如前述提到的针对变应性炎症的任意药物和治疗组合使用。

[0203] **药物组合物**

[0204] 本发明涉及能够在个体中治疗与PD-L1表达相关的临床病症、降低其风险和/或预防该病症的药物组合物;换而言之,术语“疫苗”和“药物组合物”在本文中互换使用。本发明的疫苗/药物组合物可以是包含抗原如蛋白质多肽和/或核酸分子的“传统”疫苗组合物。它们也可以是包含细胞(如源自个体并稍后加工过的修饰细胞)的组合物形式,或包含复合分子如抗体或TCR的组合物。

[0205] 通常,疫苗是能够在个体中诱导免疫反应的物质或组合物。该组合物可以包含以下一种或多种:“活性组分”如抗原(例如蛋白质、多肽、肽、核酸等)、包含一个或多个抗原连同其他元件的核酸构建体、细胞(例如加载的APC、用于过继转移的T细胞)、复合分子(抗体、TCR和MHC复合物和更多)、载体、佐剂和药用载体。下文更详细地公开本发明疫苗组合物的各种组分。

[0206] 在施用至患有(导致PD-L1表达的)癌症和/或感染的个体时,本发明的疫苗组合物能够激发针对表达SEQ ID NO:1的PD-L1或其与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的功能同源物的癌症、DC或APC的免疫反应。在一个优选实施方案中,临床病症是癌症。本发明的疫苗组合物能够在接种个体中激发产生针对表达PD-L1的癌细胞、APC和DC具有细胞毒效应的效应T细胞和/或在受试者中诱导抗原特异性T细胞在肿瘤基质中浸润。

[0207] **抗原和其他活性组分**

[0208] **基于蛋白质/多肽的疫苗组合物**

[0209] 本发明的肽优选地以高亲和力与MHC结合并且在它们呈递在此时即可用作抗原。优选地,本发明的疫苗组合物包含以下一种或多种:PD-L1 (SEQ ID NO:1),来自其中的免疫原性活性肽片段、全长和部分长度的PD-L1的功能同源物,尤其上文所述的任意片段。更优选地,疫苗组合物包含在本公开的序列表中列出的任意序列。非常优选地,疫苗组合物包含肽PDL101 (SEQ ID NO:2)、PDL111 (SEQ ID NO:12) 和/或PDL114 (SEQ ID NO:15)。

[0210] 本发明的疫苗组合物中抗原的选择将取决于本领域技术人员可确定的参数。如已经提到,本发明的每种不同肽由特定HLA分子呈递在细胞表面上。因而,如果待治疗的受试者就HLA表型进行分型,则选择已知与这种特定HLA分子结合的肽/多种肽。可选地,基于给定群体中各种HLA表型的优势率选择目的抗原。作为例子,HLA-A2是高加索人群中优势的表型,并且因此,含有与HLA-A2结合的肽的组合物在高比例的这个群体中有活性。另外,本发明的抗原/肽可以根据表2中提出的锚定残基基序修饰,以增强与特定HLA分子的结合。

[0211] 本发明的组合物也可以含有两种或更多种PD-L1衍生肽的组合,每种肽与不同的HLA分子特异性相互作用,从而覆盖较大比例的靶群体。因此,作为例子,药物组合物可以含有受HLA-A分子限制的肽和受HLA-B分子限制的肽的组合,例如包含与靶群体中HLA表型的优势率对应的那些HLA-A和HLA-B分子,例如HLA-A2和HLA-B35。另外,该组合物可以包含受HLA-C分子限制的肽。

[0212] 在基于肽的疫苗情况下,表位可以按' MHC即用 (MHC-ready) '形式施用,这使得通过与宿主抗原呈递细胞摄入和加工抗原无关的外源加载来呈递成为可能。本发明的肽包含短'MHC'即用形式和较长形式的两类肽,所述较长形式需要由蛋白酶体加工,因此提供可以靶向多种肿瘤抗原的更复杂的疫苗组合物。由靶疫苗靶向的不同HLA组越多,疫苗在多样性群体中发挥功能的可能性越高。

[0213] 本发明在优选的实施方案中涉及与佐剂组合用作药物的疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:1的PD-L1或其与SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的功能同源物或包含所述PD-L1或其所述功能同源物的连续序列的免疫原性活性肽片段或编码所述PD-L1或所述肽片段的核酸。可以施用该疫苗组合物以在个体中治疗临床病症、预防该临床病症或减少与该临床病症相关的风险。

[0214] 多表位疫苗组合物

[0215] 本发明还涉及高度免疫原性的多表位疫苗。优选地,这类疫苗应当如此设计,从而促进同时递送最适合的PD-L1衍生肽和任选地其他合适的肽和/或如本文所述的佐剂。本发明涵盖包含PD-L1衍生肽和任选的不属于或源自PD-L1的其他蛋白质或肽片段和/或如本文所述的佐剂的这类多表位疫苗。一种促进开发具有更复杂组成的疫苗的重要因素是需要靶向多种肿瘤抗原,例如通过设计包含或编码多个仔细选择的CTL和T_h细胞表位的疫苗。因此,本发明在一个方面涉及包含I类和II类限制型PD-L1表位的疫苗组合物。

[0216] 本发明的肽因此包括短'MHC即用'形式(I类限制型)和需要蛋白酶体加工的较长形式(II类限制型)的两类肽。因而,可以将本发明的组合物作为包含如本文定义的I类限制型表位和/或II类限制型表位的多表位疫苗提供。

[0217] 基于核酸的疫苗组合物

[0218] 本发明的疫苗组合物可以包含编码PD-L1或其免疫原性活性肽片段,尤其上文所述的任意片段的核酸。所述核酸可以因此编码前述提到的任意蛋白质和肽片段。核酸可以例如是DNA、RNA、LNA、HNA、PNA,优选地,核酸是DNA或RNA。

[0219] 本发明的核酸可以包含于任意合适载体(如表达载体)内部。可获得多个载体并且技术人员将能够为特定目的选择有用载体。载体可以例如是质粒、粘粒、病毒颗粒或人工染色体的形式。可以将适宜的核酸序列通过多种程序插入载体中,例如,可以使用本领域熟知的技术将DNA插入适宜的限制性核酸内切酶位点中。除本发明的核酸序列之外,载体还可以包含以下一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。载体也可以包含额外的序列,如增强子、聚腺苷酸尾、接头、多接头、可操作接头、多克隆位点(MCS)、终止密码子、内部核糖体进入位点(IRES)和用于整合的宿主同源序列或其他限定的元件。用于工程化核酸构建体的方法是本领域熟知的(见,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人编著,Cold Spring Harbor Laboratory,第2版,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989)。载体优选地是表达载体,其包含可操控的连接调节

性核酸序列的核酸，所述调节性核酸序列指导该核酸在合适的细胞中表达。在本发明的范围内，所述调节性核酸序列应当通常能够指导在哺乳动物细胞、优选地人细胞中，更优选地在抗原呈递细胞中的表达。

[0220] 在一个优选的实施方案中，载体是病毒载体。载体也可以是细菌载体，如减毒细菌载体。可以使用减毒细菌载体，目的是在感染和持续部位处诱导持久的粘膜免疫反应。不同的重组细菌都可以用作载体，例如细菌载体可以选自沙门氏菌属(*Salmonella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和李斯特氏菌属(*Listeria*)。通常而言，可以利用强烈的CTL诱导和肿瘤消退显示在小鼠中诱导针对异源抗原HPV16L1或E7的免疫。载体还可以包含编码T细胞刺激性多肽的核酸。

[0221] 加载的APC

[0222] 在有用的实施方案中，通过以下方式施用本发明的肽而激发针对癌症疾病的免疫原性反应：通过在来自个体的抗原呈递细胞(APC)上加载MHC I类或II类分子，从个体分离PBMC并将细胞与肽温育，之后将细胞注射回该个体，或通过从个体分离前体APC并使用细胞因子和抗原使细胞分化成专业型APC，之后将细胞注射回个体。

[0223] 因此本发明的一个方面是提供包含抗原呈递细胞的疫苗组合物，所述抗原呈递细胞包含PD-L1或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段或编码所述PD-L1或所述免疫原性活性肽片段的核酸。抗原呈递细胞可以是能够呈递抗原至T细胞的任何细胞。优选的抗原呈递细胞是树突细胞。可以根据任何合适的方案，例如如下文所述制备树突细胞(DC)并且将其用于治疗性方案中。本领域技术人员明白，可以对该方案进行调整以便对具有不同HLA型和不同疾病的个体使用。

[0224] 树突细胞(DC)可以用50 μ g/ml HLA限制性肽(以GMP品质合成)在37°C脉冲标记1小时，并且在第1和14日皮下施用肽和5 \times 10⁶个细胞，随后在5次接种后每4周进行额外的白细胞去除术。临床用DC的产生和质量控制可以基本上如Nicolette等人，(2007)中所述那样进行。

[0225] 因而，在本发明的一个实施方案中，一种用于治疗患有以PD-L1表达为特征的临床病症的个体的方法，优选地其中所述临床病症是癌症或感染，是这样一种方法，其中通过以下方式施用所述肽：将该肽离体呈递至该个体的抗原呈递细胞(APC)，随后将如此处理的APC注射回该个体中。存在进行这种操作的至少两个替代方式。一个替代是从个体分离APC并且将MHC I类分子与肽温育(加载)。加载MHC I类分子意指将APC与肽如此温育，从而带有对该肽特异的MHC I类分子的APC结合该肽并且因此能够将它呈递给T细胞。随后，将这些APC重新注射至个体中。另一个替代方式依赖于树突细胞生物学领域的最近发现。在这种情况下，从个体分离单核细胞(作为树突细胞前体)并且通过使用细胞因子和抗原在体外分化成专业型APC(或树突细胞)。随后，体外产生的DC用该肽脉冲标记并注射至个体中。

[0226] 过继免疫疗法/过继转移

[0227] 本发明的重要方面涉及在体外培育PD-L1特异性T细胞并将这些细胞过继转移至个体。过继转移意指医师直接转移免疫系统的已经能够产生特异性免疫反应的实际组分至个体中。

[0228] 本发明的一个目标是提供可以例如用于过继转移的PD-L1特异性T细胞。可以将包含能够与PD-L1肽/MHC I类或PD-L1肽/MHC II类复合物特异性结合的T细胞受体的分离T细

胞过继转移至个体,所述T细胞优选地是已经在体外扩充的T细胞,其中所述PD-L1肽可以是上文中提到的任意PD-L1肽。体外扩充T细胞的方法是技术人员熟知的。本发明还涉及治疗的方法,所述方法包括将包含能够与MHC限制型PD-L1肽复合物特异性结合的T细胞受体的T细胞施用至个体,如患有癌症疾病的人类,其中所述PD-L1衍生肽可以是上文中提到的任意PD-L1肽。本发明还涉及包含能够与PD-L1或其肽片段特异性结合的T细胞受体的T细胞用于制备治疗癌症或感染的药物的用途。自体T细胞转移可以基本上如Walter等人,(1995)中所述进行。

[0229] TCR转移

[0230] 在又一个实施方案中,可以在过继转移之前照射这类T细胞以控制在个体中的增殖。可以通过TCR基因转移将T细胞的特异性遗传工程化(Engels等人,2007)。这可以将携带PD-L1肽特异性的T细胞转移至个体中。通常而言,使用T细胞用于过继免疫疗法是有吸引力的,因为它可以在无肿瘤或无病毒的环境下扩充T细胞并且在输注之前分析T细胞功能。与转移T细胞系相比,在过继转移中采用TCR基因修饰的T细胞(如用指导异源TCR表达的表达构建体转化的T细胞)具有几个优点:(i)重定向T细胞的产生通常是适用的。(ii)可以选择或产生高亲和力或极高亲和力的TCR并且用来工程化T细胞。(iii)可以使用密码子优化或鼠化TCR产生高亲合力T细胞,从而允许更好地表面表达稳定的TCR。通过T细胞受体(TCR)基因转移对T细胞特异性的遗传工程可以基本上如Morgan等人,(2006)中所述那样进行。

[0231] TCR转染

[0232] 具有已知抗肿瘤反应性的TCR可以按遗传方式引入人原代T淋巴细胞中。可以将编码来自肿瘤特异性CTL克隆的TCRa链和β链的基因转染至原代T细胞中,并且以这种方式用针对肿瘤抗原的特异性重编程T细胞。通过电穿孔法将TCR RNA转染至PBMC中(Schaft等人,2006)。可选地,可以使用逆转录病毒载体,通过TCR基因转移为T细胞提供新的特异性(Morgan等人,2006)。然而,来自逆转录病毒载体的前病毒可能在转染的细胞的基因组中随机整合并随后扰动细胞生长。用编码TCR的RNA电穿孔T细胞克服了这个缺点,因为RNA仅在转染的细胞中短暂存在并且不能整合在基因组中(Schaft等人,2006)。另外,使用细胞转染在实验室中是常规的。

[0233] 佐剂和载体

[0234] 本发明的疫苗组合物优选地包含佐剂和/或载体。下文中给出有用佐剂和载体的例子。因而,SEQ ID NO:1的PD-L1、其功能同源物或其免疫原性活性肽片段可以在中本发明的组合物与佐剂和/或载体结合。

[0235] 佐剂是其混入疫苗组合物中增加或调节PD-L1或其肽片段的免疫反应的任何物质,见下文进一步描述。载体是能够与PD-L1或其肽片段结合并且特别辅助呈递本发明肽的支架结构物,例如多肽或多糖。

[0236] 本发明的许多肽都是相对小的分子并且可能因此需要在如本文所述的组合物中使所述肽与多种物质如佐剂和/或载体组合,以产生疫苗、免疫原性组合物等。按广泛定义,佐剂是促进免疫反应的物质。在Goding,Monoclonal Antibodies:Principles&Practice(第2版,1986)中第61-63页提供对佐剂的一般讨论。Goding指出,当目的抗原具有低分子量或不良免疫原性时,推荐与免疫原性载体偶联。这类载体分子的例子包括匙孔槭血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白和鸡免疫球蛋白。也已经提出各种皂素提取物可用作免疫原性组

合物中的佐剂。已经提出使用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) (一种熟知的细胞因子)作为佐剂(WO97/28816)。

[0237] 载体可以独立于佐剂存在。载体的功能可以例如是尤其增加肽片段的分子量,目的是增加它们的活性或免疫原性、赋予稳定性、增加生物活性或增加血清半寿期。另外,载体可以有助于呈递PD-L1多肽或其所述片段至T细胞。载体可以是本领域技术人员已知的任何合适载体,例如蛋白质或抗原呈递细胞。载体蛋白可以是但不限于、匙孔槭血蓝蛋白、血清蛋白如转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白、免疫球蛋白或激素,如胰岛素或棕榈酸。为了免疫人,载体必须是对人而言生理可接受且安全的载体。然而在本发明的一个实施方案中,破伤风类毒素和/或白喉类毒素是合适的载体。可选地,载体可以是葡聚糖,例如琼脂糖凝胶。

[0238] 因而,本发明的一个方面是包含SEQ ID NO:1的PD-L1、其具有至少70%序列同一性的功能同源物或上文所述的任意免疫原性活性肽片段的疫苗组合物与载体如上述蛋白质或抗原呈递细胞如树突细胞(DC)结合。

[0239] 本发明的疫苗组合物通常包含佐剂。佐剂可以例如选自:AlK (SO_4)₂、AlNa (SO_4)₂、AlNH₄ (SO_4)、二氧化硅、明矾、Al (OH)₃、Ca₃ (PO₄)₂、高岭土、碳、氢氧化铝、胞壁酰二肽、N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺(thr-DMP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺(CGP11687,也称作nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰基氧)-乙胺(CGP19835A,也称作MTP-PE)、在2%鲨烯/Tween-80.RTM.乳液中的RIBI (MPL+TDM+CWS)、脂多糖及其各种衍生物,包括脂质A、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂、Merck佐剂65、多核苷酸(例如,聚IC和聚AU酸)、来自结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的蜡D、存在于短棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)和布氏杆菌属(*Bacillus*)成员中的物质、Titermax、ISCOMS、Quil A、ALUN(见US58767和5,554,372)、脂质A衍生物、霍乱毒素衍生物、HSP衍生物、LPS衍生物、合成肽基质或GMDP、白介素1、白介素2、Montanide ISA-51和QS-21。待随本发明一起使用的优选佐剂包括基于油/表面活性剂的佐剂如Montanide佐剂(从比利时Seppic可获得),优选地是Montanide ISA-51。其他优选的佐剂是基于细菌DNA的佐剂,如包含CpG寡核苷酸序列的佐剂。然而,其他优选的佐剂是基于病毒dsRNA的佐剂,如聚I:C。咪唑并喹啉(imidazochinilines)是优选佐剂的又一个例子。最优选的佐剂是适于人使用的佐剂。

[0240] Montanide佐剂(均从比利时Seppic可获得)可以选自Montanide ISA-51、Montanide ISA-50、Montanide ISA-70、Montanide ISA-206、Montanide ISA-25、Montanide ISA-720、Montanide ISA-708、Montanide ISA-763A、Montanide ISA-207、Montanide ISA-264、Montanide ISA-27、Montanide ISA-35、Montanide ISA51F、Montanide ISA016D和Montanide IMS,优选地选自Montanide ISA-51、Montanide IMS和Montanide ISA-720,更优选地选自Montanide ISA-51。Montanide ISA-51(Seppic, Inc.)是基于油/表面活性剂的佐剂,其中不同的表面活性剂与不可代谢性矿物油、可代谢性油或二者的组合。将它们制备为随水溶液一起使用的乳液,所述水溶液包含SEQ ID NO:1的PD-L1、其上文所述的任意功能同源物或其上文所述的任意免疫原性活性肽片段。表面活性剂是二缩甘露醇油酸酯。QS-21(Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham,

MA) 是作为水溶液操作的高度纯化的水溶性皂素。QS-21 和 Montanide ISA-51 佐剂可以在无菌单次使用的小瓶中提供。

[0241] 熟知的细胞因子 GM-CSF 是本发明的另一种优选佐剂。已经使用 GM-CSF 作为佐剂持续十年并且它可以优选地是如 WO97/28816 中所述的 GM-CSF。

[0242] 在本发明范围内还涉及疫苗组合物可以包含多于一种不同的佐剂并且因此本发明的疫苗组合物可以包含上文中提到的佐剂的混合物。另外，在本发明范围内还涉及疫苗组合物以及至少一种其他佐剂均可以同时或以任意顺序依次施用至有需求的个体。

[0243] 下表中列出本发明能够使用的佐剂的有利官能性。

[0244] 表3: 佐剂作用模式

作用	佐剂类型	益处
1. 免疫调节作用	通常是调节细胞因子网络的小分子或蛋白质	免疫反应上调。Th1 或 Th2 的选择
2. 剂型	通常是以其天然构象与免疫原相互作用的两亲分子或复合物	增加的中和抗体反应。更长的反应持续期
3. CTL 诱导	<ul style="list-style-type: none"> 可以结合或包围免疫原 胞膜的粒子 	蛋白质的胞质加工产生正 并且可以融合于或破坏细 胞表面 MHC-1 的 w/o 乳液
[0245]		如果杂乱肽已知，则方法 <ul style="list-style-type: none"> 用于将肽直接连接至细胞表面 MHC-1 的 w/o 乳液
4. 靶向	<ul style="list-style-type: none"> 结合免疫原的颗粒状佐剂 靶向巨噬细胞和 DC 上凝集素受体的糖类佐剂 	佐剂和免疫原的高效使用 如上。如果靶向是选择性的，也可以确定反应的类型
5. 贮库产生	<ul style="list-style-type: none"> 短期用 w/o 乳液 长期用微球体或纳米球 	效率 单次剂量疫苗的潜力

[0246] 来源: Cox, J.C. 和 Coulter, A.R. (1997). Vaccine 15, 248-56.

[0247] 本发明的疫苗组合物可以包含多于一种佐剂。另外，本发明涵盖一种治疗性组合物，其进一步包含任意佐剂物质和/或包含前述任一者或其组合的载体。还涉及 PD-L1 蛋白质、其功能同源物或其任意免疫原性活性肽片段和佐剂可以按任何合适的顺序单独施用。优选地，本发明的疫苗组合物包含 Montanide 佐剂如 Montanide ISA51 或 Montanide ISA720 或 GM-CSF 佐剂或其混合物。

[0248] 因此，本发明涵盖一种治疗性组合物，其进一步包含佐剂物质，所述佐剂物质包含

前述任一者或其组合。还涉及抗原即本发明肽和佐剂可以同时施用或按任何合适的顺序单独施用。

[0249] 剂量和施用

[0250] 根据具体应用,PD-L1或其免疫原性活性肽片段在疫苗组合物中的量可以变动。然而,PD-L1或其肽片段的单次剂量优选地是在约10 μ g至约5000 μ g、更优选地约50 μ g至约2500 μ g,如约100 μ g至约1000 μ g的任何量。施用模式包括皮内、皮下和静脉内施用、以时间释放制剂形式植入等。本文中涵盖本领域已知的任何和全部施用形式。还涵盖了本领域已知适合配制可注射用免疫原性肽组合物的任何和全部常规剂型,如冻干形式和溶液剂、悬剂或乳剂形式,如果需要,所述剂型含有常规的可药用载体、稀释剂、防腐剂、辅助剂、缓冲组分等。

[0251] 可以使用本领域技术人员已知的任何常规方案制备并施用药物组合物。在实施例2中,给出制备本发明疫苗组合物的非限制性例子以及施用此类疫苗的非限制性例子。本领域技术人员理解,该方案可以容易地适应于本文所述的任何疫苗组合物。在本发明的又一个实施方案中,本发明的药物组合物可用于治疗患有以PD-L1表达为特征的临床病症如癌症和感染的个体。

[0252] 可以使用本领域技术人员已知的几种方法确定本发明组合物的免疫保护作用。也可以通过免疫后出现DTH反应和/或检出特异性识别疫苗组合物的肽的抗体确定成功的免疫反应。

[0253] 本发明的疫苗组合物可以以治疗有效量施用至个体。

[0254] 药物组合物可以通过多种途径如皮下、局部、口服和肌内途径向个体提供。经口或经肠胃外方式实现药物组合物的施用。肠胃外递送方法包括局部、动脉内(直接至组织)、肌内、皮下、髓内、鞘内、心室内、静脉内、腹膜内或鼻内施用。本发明还具有以下目的:提供合适的局部、口服、全身性和肠胃外药物制剂用于利用疫苗组合物的预防和治疗中。

[0255] 例如,疫苗组合物可以以诸如片剂、胶囊剂(各自包括定时释放和持续释放制剂)、丸剂、散剂、颗粒、酏剂、酊剂、溶液剂、悬剂、糖浆剂和乳剂的口服剂型或通过注射施用。同样地,它们也可以按静脉内(大丸剂和输注)、腹膜内、皮下、在具有或不具有闭塞的情况下局部用或肌内形式施用,全部使用形式均是制药领域普通技术人员熟知的。可以使用有效但无毒量的包含本文中所述的任何化合物的疫苗作为预防药或治疗药。还涵盖了本领域已知适合配制可注射用免疫原性肽组合物的任何和全部常规剂型,如冻干形式和溶液剂、悬剂或乳剂形式,如果需要,所述剂型含有常规的可药用载体、稀释剂、防腐剂、辅助剂、缓冲组分等。

[0256] 本发明疫苗组合物的优选施用模式包括但不限于全身性施用,如静脉内或皮下施用、皮内施用、肌内施用、鼻内施用、口服施用、直肠施用、阴道施用、肺施用和总体上任何形式的粘膜施用。另外,处于本发明范围内的是,本发明中包括用于本文中提到的任何施用形式的方法。

[0257] 本发明的疫苗可以施用一次,或任何次数,如两次、三次、四次或五次。在一个实施方案中,可以将本发明的疫苗组合物施用任何次数,如头两年每月1次,此后每三月施用一次持续至少两年,如三年、四年或五年。施用疫苗多于一次具有加强所产生的免疫反应的作用。疫苗还可以通过以与先前施用不同的形式或在与先前不同的身体部分中施用来强化。加强接种是同源或异源加强接种。同源加强接种是这样的情况,其中第一和后续接种包含

相同的构建体并且更具体地相同的递送载具，特别是相同的病毒载体。异源加强接种是这样的情况，其中相同的构建体包含于不同的病毒载体内。

[0258] 第二活性成分

[0259] 本发明的一个方面是本文中提供的疫苗组合物与第二活性成分组合使用。疫苗组合物和第二活性成分的施用可以是依次或合并的。上文给出用于癌症和感染的第二活性成分的例子。又一个方面是疫苗组合物可以与对于待治疗的给定临床病症有意义的其他疗法组合使用。这类治疗可以包括手术、化疗或基因治疗、免疫刺激物质或抗体；本领域技术人员能够针对给定的情况确定适宜的组合治疗。

[0260] 在一些情况下，本发明的治疗方法与其他医学治疗如化疗、放疗法、用免疫刺激物质治疗、基因治疗、用抗体和/或抗生素治疗和使用树突细胞治疗组合将是适宜的。

[0261] 诊断及预后工具

[0262] 本发明的肽为开发在癌和感染疾病中广泛适用的诊断和预后方法提供基础。因而，在其他有用的实施方案中，本发明的组合物是用于离体或原位诊断个体中存在表达PD-L1的细胞的组合物。诊断方法基于在PBMC当中或在肿瘤组织中检测到PD-L1反应性T细胞。

[0263] 因此，提供一种用于离体或原位诊断PBMC当中或肿瘤组织中存在PD-L1反应性T细胞的诊断试剂盒，所述试剂盒包含本发明的一种或多种肽，以及提供一种检测个体中这类反应性T细胞存在的方法，所述方法包括使肿瘤组织或血液样品与本发明肽和HLA I类或II类分子或这种分子的片段的复合物接触并检测该复合物与组织或血细胞的结合。在一个方面，本发明提供本发明肽和HLA I类或II类分子或这种分子的片段的复合物，所述复合物可用作诊断试剂，如本文所述。这种复合体可以是单聚或多聚体。

[0264] 另一种有用的诊断或预后方法基于在异源动物物种中产生抗体，例如针对人PD-L1的鼠抗体，所述抗体随后可以例如用来诊断呈递该肽的癌细胞的存在。出于这类免疫目的，肽的量可以比体内治疗（如上文所提到）过程中所用的量小。通常而言，优选的剂量可以是约1 μ g至约750 μ g肽。还可能基于用本发明肽免疫产生单克隆抗体。因此，本发明还涉及能够与本发明肽特异性结合的分子，尤其单克隆或多克隆抗体，包括其片段，并涉及能够阻断这种结合的分子，例如针对抗本发明肽的单克隆或多克隆抗体所产生的抗体。本发明还涉及能够与本发明肽或蛋白质特异性结合的分离的T细胞受体以及涉及编码所述受体的分离核酸。这类T细胞受体可以例如使用技术人员熟知的标准技术从蛋白质或肽特异性T细胞克隆。

[0265] 在一个方面，本发明还涉及分离的T细胞，所述T细胞包含能够与PD-L1和/或其本文所述的任何免疫原性活性肽片段特异性结合的T细胞受体。分离的T细胞可以是CD8T细胞或CD4T细胞。分离的T细胞优选地是已经在体外扩充的T细胞。体外扩充T细胞的方法是技术人员熟知的。这类T细胞可以特别用于通过过继转移或自体细胞转移治疗癌症。因而，本发明还涉及包含T细胞的药物组合物以及治疗方法，所述治疗方法包括向有需求的个体如患有癌症和/或感染的个体施用T细胞，所述T细胞包含能够与PD-L1或其肽片段特异性结合的T细胞受体。自体细胞转移可以基本上如Walter等人，(1995) 中所述进行。

[0266] 本发明提供了用于治疗、预防、减轻或治愈以表达PD-L1为特征的临床病症如癌症和感染、优选癌症的手段，所述手段包括向患有该疾病的个体施用有效量的如本文定义的组合物、能够与肽片段特异性结合的分子，所述分子可以例如是抗体或T细胞受体或者本文

所述的组分套装。因此,本发明的又一个方面是提供一种治疗与SEQ ID NO:1的PD-L1表达相关的临床病症的方法。

[0267] 监测免疫接种

[0268] 在优选的实施方案中,本发明的药物组合物是疫苗组合物。因此本发明的意义和一个方面是在对其施用本发明疫苗组合物的个体中监测免疫接种。该疫苗组合物可以因此能够激发针对癌症和/或感染的免疫反应。如本文所用,表述“疫苗组合物”指激发针对表达PD-L1的细胞如癌细胞、APC或DC的至少一种类型免疫反应的组合物。因而,这种免疫反应可以是以下任一种:CTL反应,其中产生了能够识别在细胞表面上呈递的HLA/肽复合物,从而导致细胞溶解的CTL,即疫苗在接种的受试者中激发产生针对癌细胞具有细胞毒效应的效应T细胞;导致抗癌抗体产生的B-细胞反应;和/或DTH型免疫反应。本发明的一个目的是通过在施用本发明的组合物至所述个体后监测前述任一种反应,监测该个体的免疫接种。

[0269] 在一个方面本发明涉及监测免疫接种的方法,所述方法包括步骤

[0270] i) 提供来自个体的血液样品

[0271] ii) 提供SEQ ID NO:1的PD-L1、其上文所述的任何功能同源物或其上文所述的任何免疫原性活性肽片段,

[0272] iii) 确定所述血液样品是否包含与该蛋白质或肽特异性结合的抗体或包含与该蛋白质或肽特异性结合的T细胞受体的T细胞,

[0273] iv) 因而确定在所述个体中是否已经生成针对所述蛋白质或肽的免疫反应。

[0274] 个体优选地是人类,例如已经用PD-L1或其肽片段或编码所述蛋白质或肽的核酸免疫的人类。

[0275] 组分套装

[0276] 本发明还涉及一种组分套装,其包含;

[0277] • 本文所述的任何疫苗组合物和/或

[0278] • SEQ ID NO:1的PD-L1或其上文所述的任何功能同源物和/或

[0279] • 上文所述的PD-L1的任何免疫原活性多肽片段,和/或

[0280] • 编码以上两个要点的蛋白质的任何核酸

[0281] 和关于如何使用组分套装的说明书。

[0282] 本发明还涉及一种组分套装,其包含;

[0283] • 本文所述的任何疫苗组合物和/或

[0284] • SEQ ID NO:1的PD-L1或其上文所述的任何功能同源物和/或

[0285] • 上文所述的PD-L1的任何免疫原性活性肽片段和/或

[0286] • 编码以上两个要点的蛋白质的任何核酸

[0287] 和第二活性成分。

[0288] 优选地,根据待治疗的临床病症选择第二活性成分选,从而在要治疗癌症的情况下,第二活性成分例如选自如上文所列的化疗药。同样地,如果治疗微生物感染/病毒性感染,第二活性成分优选地是抗生素和/或抗病毒药。

[0289] 组分套装的组分优选地包含于单独的组合物中,然而处于本发明的范围内的是:组分套装的组分均包含于同一组合物内部。组分套装的组分因此可以同时施用或以任何顺序依次地施用。

实施例

[0290] 实施例1

[0291] 患者

[0292] 从癌症患者(肾细胞癌、黑色素瘤和乳腺癌)和健康对照采集外周血单核细胞(PBMC)。在终止任何种类的抗癌疗法后最少4周抽取血液样品。使用Lymphoprep分离法分离PBMC、进行HLA-分型(丹麦哥本哈根大学医院临床免疫学部)并在含有10%DMSO的FCS中冷冻。方案由丹麦首都区科学伦理委员会批准并根据赫尔辛基宣言条款实施。在进入研究之前从患者获得书面知情同意书。

[0293] ELISPOT测定法

[0294] 如先前所描述,使用ELISPOT测定法量化释放IFN- γ 的肽特异性效应细胞(Andersen等人,2001,Cancer Res.61:869-872)。在一些实验中,如所述那样,在分析之前在体外用肽刺激PBMC一次(McCutcheon等人,J Immunol Methods 210:149-166)以扩展测定法的灵敏度。简而言之,将硝酸纤维素铺底的96孔板(MultiScreen MAIP N45;Millipore)用IFN- γ 捕获mAb(Mabtech)包被过夜。将孔洗涤,用X-vivo培养基封闭并且将效应细胞(所收集的PBMC,并且当指示时如上文所述那样刺激)一式两份以不同的细胞浓度在具有或没有10 μ M肽的情况下添加。将平板温育过夜。次日,弃去培养基并洗涤各孔,此后添加有关的相关的生物素酰化第二抗体(Mabtech)之前。将平板在室温(RT)温育2小时,洗涤,并且将抗生物素蛋白-酶结合物(AP-抗生物素蛋白;Calbiochem/nvitrogen Life Technologies)添加至每个孔。将平板在室温温育1小时并将酶底物NBT/BCIP(Invitrogen Life Technologies)添加至每个孔并在室温温育5-10分钟。一旦出现深紫色点,通过用自来水洗涤终止反应。使用ImmunoSpot系列2.0分析仪(CTL分析仪)计数点。

[0295] 抗原特异性T细胞培养物和克隆的建立

[0296] 来自黑色素瘤患者的PBMC用照射过(20Gy)的加载PD-L101肽的自体DC刺激(PBMC:DC比率=3x10⁶:3x10⁵)。次日添加IL-7(5ng/ml)和IL-12(10ng/ml)(PeproTech,伦敦,UK)。每10日用加载PDL101的照射过的自体DC(2×)随后用加载I κ B10的照射过的自体PBMC(3×)实施培养物的刺激。在每次刺激后添加120U/ml IL-2(PeproTech,伦敦,UK)。在一个月生长后,在标准⁵¹Cr-释放测定法中检验培养物特异性。

[0297] 细胞毒测定法

[0298] 如他处所述那样实施用于CTL介导细胞毒性的常规⁵¹Cr-释放测定法(Andersen等人,1999)。靶细胞具有或没有PDL101的T2(图3a)和HLA-A2+乳腺癌细胞系-乳腺癌细胞系MDA-MB-231(图3b)(可在美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得)。

[0299] 结果

[0300] 针对PD-L1的HLA-A2限制性免疫反应

[0301] 从主要HLA-A2特异性锚定残基对PD-L1蛋白的氨基酸序列筛选最可能的HLA-A2九肽和十肽表位(见表2)。选择并随后合成17种PD-L1衍生肽。使用ELISPOT IFN- γ 分泌测定法,我们对来自癌症患者和健康个体的PBMC检查针对这些PDL1衍生肽的特异性T细胞反应的存在。在通过ELISPOT检查之前,用不同肽在体外刺激来自HLA-A2 $^+$ 晚期癌症患者(乳腺癌、黑色素瘤和肾细胞癌)的PBMC一次。检测针对PDL101(LLNAFTVT;PD-L1₁₅₋₂₃,SEQ ID NO:2))、PDL111(CLGVALTFI;PDL1₂₅₀₋₂₅₈,SEQ ID NO:12)和PDL114(VILGAILLCL;PDL1₂₄₂₋₂₅₁,SEQ ID NO:13)的T细胞反应。

NO:15)的ELISPOT反应。此外,我们还检查了来自健康个体的PBMC对这三种PDL1衍生肽的反应性。在1图中显示结果,所述结果显示采用如本文以上所述的肽体外刺激一次后所测定的PDL1特异性点/5x10⁵个PBMC。

[0302] 除使用IFN γ 作为标记确定特异性T细胞的存在之外,还使用TNF α 作为标记。因而,基本上如上文所述用PDL101肽进行ELISPOT测定法,所述测定法包括用所述肽体外刺激一次,不同在于使用TNF α 抗体替代IFN γ 抗体。图2B显示结果。

[0303] 检测癌症患者中PD-L1-反应性HLA-A2限制性T细胞

[0304] PD-L1-反应性T细胞的频率因体外刺激明显增加,还在选择的患者中可轻易地离体检出PDL1-反应性T细胞:在体外刺激后存在强烈反应的六位患者中,也离体检出相应的反应性。在图2A中显示结果,所述结果结果显示采集后立即(即在不进行体外刺激的情况下)在PBMC上测定的PDL1特异性点/5x10⁵个PBMC。

[0305] PD-L1特异性T细胞的功能能力

[0306] 鉴定到针对PDL101肽存在反应的患者后,发明人使用来自这类患者的PBMC以体外产生针对这种肽的特异性T细胞培养物。如上文所述,通过PD-L1脉冲标记的自体树突细胞(DC)刺激PBMC。在4轮刺激后,在标准⁵¹Cr-释放测定法中检验肽特异性。为此目的,未加载的T2细胞或加载有I κ B10肽的T2细胞充当靶。这种测定法揭示,仅杀死用PD-L101脉冲标记的T2细胞(图3)。接下来,进一步使用PD-L1特异性T细胞培养物来检验杀死HLA-A2阳性癌细胞系的能力。

[0307] 接下来,通过有限稀释法从特异性T细胞培养物建立CTL克隆。在短暂扩充步骤后,在标准⁵¹Cr释放测定法中分析正在生长的克隆的特异性。克隆9有效地溶解用PD-L1脉冲标记的T2细胞。同样地,从特异性大体积培养(specific bulk culture)产生的克隆9能够杀死MDA-MB-231乳腺癌细胞。

[0308] 实施例2

[0309] 疫苗组合物

[0310] 将500 μ L磷酸盐缓冲液中的500 μ g PD-L1肽(PDL101、PDL111或PDL115)与500 μ LMontanide佐剂(Seppic,法国)混合并施用至患者。此外,75 μ g Leukine(沙格司亭;GM-CSF-从美国Genzyme可获得)用于刺激免疫系统。疫苗组合物和GM-CSF均通过皮下注射施用。接种区域额外用Aldara(Imiquimod-从瑞典MEDA AB可获得)局部处理以增加局部免疫反应。

[0311] 实施例3

[0312] 患者

[0313] 从健康个体和癌症患者(黑色素瘤、肾细胞癌和乳腺癌)采集外周血单核细胞(PBMC)。在终止任何种类的抗癌疗法后最少4周抽取血液样品。使用Lymphoprep分离法分离PBMC、进行HLA-分型并在含有10%DMSO的FCS中冷冻。方案由丹麦首都区科学伦理委员会批准并根据赫尔辛基宣言条款实施。在进入研究之前从患者获得书面知情同意书。

[0314] 预测来自PD-L1的HLA-A2结合肽

[0315] 为了鉴定PD-L1的HLA-A2限制型CTL表位,使用互联网上可获得的“数据库SYFPEITHIP”(15)分析PD-L1的氨基酸序列。9聚物(这里名为“PD-L101”)PDL1₁₅₋₂₃(LLNAFTVTV)由SYFPEITHI算法评分为30,并且作为第一候选表位出现。产生PD-L101肽和来

自PD-L1的两个长多肽;PDLong1:PDL1₉₋₂₈,FMTYWHLNAFTVTPKDL和PDLong2:PDL1₂₄₂₋₂₆₄,VILGAILLCLGVALTFIFRLRKG。仅前者(PDLong1)包含PD-L101的序列。使用HLA-A2高亲和力结合表位HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄(ILKEPVHGV)和CMV pp65pos₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)作为无关对照。

[0316] ELISPOT测定法

[0317] 在本研究中,ELISPOT根据CIP提供的指南进行(http://cimt.eu/cimt/files/d1/cip_guidelines.pdf)。在一些实验中,如所述那样,在分析之前在体外用肽刺激PBMC一次以扩展测定法的灵敏度。简而言之,将硝酸纤维素铺底的96孔板(MultiScreen MAIP N45; Millipore)用相关的抗体包被过夜。将孔洗涤,用X-vivo培养基封闭并且一式三份(如果可能),否则一式两份以不同的细胞浓度在具有或没有肽的情况下添加效应细胞。将平板温育过夜。次日,弃去培养基并洗涤各孔,此后添加相关的生物素酰化第二抗体(Mabtech),随后添加抗生物素蛋白-酶结合物(AP-抗生物素蛋白;Calbiochem/Invitrogen Life Technologies)并最终添加酶底物NBT/BCIP(Invitrogen Life Technologies)。使用ImmunoSpot系列2.0分析仪(CTL分析仪)计数点。ELISPOT反应的定义基于CIP通过经验方法或统计方法提供的指南和推荐;前者设定代表生物学反应的阈值。这得到CIP指南支持,所述CIP指南显示阈值应当定义为每100,000个PBMC>6个特异性点。非参数分布不拘再抽样(DFR)检验给出了正式比较抗原刺激孔与阴性对照孔的方式。最低地,ELISPOT测定法必须至少一式三份进行。另外,将非参数非配对Mann-Whitney检验用来比较癌症患者和健康供体之间的PD-L101特异性应答者。

[0318] 建立抗原特异性T细胞培养物

[0319] 建立了两个PD-L101特异性T细胞培养物。来自乳腺癌患者(CM.21)和来自黑色素瘤(MM.05)患者的PBMC用照射过的加载PD-L101的自体DC刺激。次日添加IL-7和IL-12(PeproTech,伦敦,UK)。每8日用加载PD-L101的照射过的自体DC(2×)随后用加载PD-L101的照射过的自体PBMC实施对培养物的刺激。在肽刺激次日添加IL-2(PeproTech,伦敦,UK)。

[0320] DC的产生

[0321] 从在37℃在RPMI-1640中于培养皿上贴壁1-2小时的PBMC产生DC。将贴壁的单核细胞在补充有10%胎牛血清的RPMI-1640中在IL-4(250U/mL)和GM-CSF(1000U/mL)存在的情况下培养6日。通过添加IL-β(1000U/ml)、IL-6(1000U/ml)、TNF-α(1000U/ml)和PGE₂(1μg/ml)使DC成熟。

[0322] 细胞毒测定法

[0323] 如Andersen等人,J Immunol1999中所述那样针对CTL介导细胞毒性实施常规⁵¹Cr-释放测定法。靶细胞是在添加或不添加IFN-γ(100U/ml)2日情况下的T2-细胞、EBV转化的HLA-A2⁺B细胞系(KIG-BCL)、成熟的自体DC(mDC)、HLA-A2⁺黑色素瘤细胞系(MM1312.07和MM.909.06)。在添铬之前,将T2-细胞和KIG-BCL在37℃用PD-L1重组蛋白(Sino Biological Inc.)脉冲标记3小时。使用抗HLA-A2FITC结合抗体(2μg/100μl,BD Biosciences)阻断T2-细胞的溶解。

[0324] HLA肽交换技术和ELISA

[0325] 为评价HLA-肽复合物的亲和力,如先前所述(19),将UV交换方法与夹心ELISA组合使用。使用两种强结合肽(HLA-A2/CMV pp65pos₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)和HLA-A2/HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄(ILKEPVHGV))和一份未暴露于UV光的样品作为阳性对照,同时使用一份无拯救肽的样品作

为阴性对照。一式四份产生阳性对照并且一式三份产生PD-L101肽。

[0326] siRNA介导的PD-L1沉默

[0327] 从Invitrogen (Invitrogen, Paisley, UK) 获得用于定向沉默PD-L1的隐形 (stealth) siRNA双链体和推荐的用于中等GC含量的隐形siRNA阴性对照双链体。隐形PD-L1 siRNA双链体由有义序列5'-CCUACUGGCAUUUGCUGAACGCAUU3' 和反义序列5'-AAUGCAGCAAAUGCCAGUAGG-3' 组成。对于PD-L1沉默实验, 使用电穿孔参数, 用PD-L1 siRNA转染mDC。

[0328] 流式细胞分析

[0329] 在FACSCANTO II (BD Biosciences, San Jose CA, 美国) 上进行流式细胞分析, 以确定在siRNA定向沉默之前和之后的mDC上、在IFN- γ 处理或不作IFN- γ 处理情况下的T2-细胞、KIG-BCL和HLA-A2 $^+$ 黑色素瘤细胞系 (MM1312.07和MM.909.06) 上的PD-L1表面表达。将细胞在PBS/1%BSA中洗涤并随后用FITC结合或PE-Cy5结合的抗-PD-L1单克隆抗体在冰上于PBS/1%BSA中染色30分钟。使用非反应性同种型匹配的抗体 (BD Biosciences) 作为对照。使用FACSDiva软件 (BD Biosciences) 和FlowJo软件 (Tree Star, AshlandOR, 美国) 进行荧光分析。

[0330] HLA-多聚体染色

[0331] 为了多聚体/四聚体染色, 使用MHC-肽交换技术制备与PE和APC偶联的四聚体。用CD3-AmCyan、CD8-太平洋蓝、CD4-FITC (BD Bioscience) 和与APC/PE结合的HLA-四聚体复合物HLA-A2/PD-L101 (PDL₁₅₋₂₃; LLNAFTTV) 或HIV-1 (pol₄₇₆₋₄₈₄; ILKEPVHGV) 进行染色。在FACS分析之前添加死细胞标记7-AAD-PerCP (BD Bioscience)。为了富集, 将T细胞培养物用与PE结合的HLA-A2/PD-L101四聚体染色并随后用抗PE微珠 (MACS Miltenyi Biotec) 分离。

[0332] 在一些实验中, 细胞用PD-L101肽 (0.2mM) 或无关HIV肽刺激并用CD107a-PE抗体 (BD Biosciences) 在37°C 染色4小时。随后, 将细胞用四聚体表面标记染色并分析FACSCANTO II (BD Biosciences, San Jose CA, 美国)。

[0333] 结果

[0334] 针对PD-L1的天然T细胞反应

[0335] 使用在互联网可获得的“数据库SYFPEITHIP”对PD-L1蛋白的氨基酸序列筛选最可能的HLA-A2九肽和十肽表位。名为“PD-L101”的肽PD-L1₁₅₋₂₃ (LLNAFTTV) 预测评分为30而作为第一候选物出现, 并且随后合成这种肽。使用IFN- γ ELISPOT分泌测定法, 发明人检查了来自健康个体以及癌症患者的外周血单核细胞 (PBMC) 针对这种PD-L1-衍生肽的特异性T细胞反应的存在。ELISPOT测定法先前已经用于基于癌症患者中的自发免疫力鉴定新肿瘤抗原。因而, 在ELISPOT检测前, 来自乳腺癌、肾细胞癌或黑色素瘤患者的HLA-A2 $^+$ PBMC用PD-L101体外刺激一次。在几位患者中检测到针对PD-L101的频繁和强烈的反应。图4A例举了一位肾细胞癌患者 (RCC.46) 和两位黑色素瘤患者 (MM.04和MM.13) 中的PD-L101特异性T细胞反应。总体而言, 通过IFN- γ ELISPOT揭示PD-L1-反应性T细胞在HLA-A2 $^+$ 癌症患者的血液中存在 (图4B)。此外, 检测了来自健康个体的PBMC针对PD-L1的反应性 (图4B)。虽然PD-L1特异性T细胞可以在健康个体的PBMC中找到, 但是它的频率比癌症患者中的频率更低, 尽管Mann-Whitney检验显示这种差异并非完全达到显著性 ($P=0.06$)。为了阐释该数据, 将8位反应患者在图4C中以条形图绘图, 其中针对每位患者将各反应与背景比较。仅一式两份进行

IFN- γ ELISPOT以节约材料,并且因此,仅通过CIMT免疫指导计划(CIP)指南建议的经验方法认定反应。如果PD-L101特异性细胞额外地释放细胞因子TNF- α ,则我们进一步检查来自PD-L1 IFN- γ 响应患者的PBMC。这些实验一式三份进行。可以从图4D看出,以PD-L1衍生的表位刺激时,天然PD-L101特异性细胞额外地释放TNF- α 。在全部8位患者中,使用非参数分布不拘再抽样(DFR)检验,TNF- α 反应达到显著性。

[0336] 接下来,发明人针对三位响应患者直接离体检查在无体外肽刺激情况下PD-L101特异性细胞的存在。图5A中例举了直接ELISPOT。体外刺激明显增加了PD-L1-反应性T细胞的频率,在所选择的患者中可容易地离体检出PD-L1-反应性T细胞(图5B)。

[0337] 通过使用肽交换技术以及随后的ELISA与两种HLA-A2限制性高亲和力表位即HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄(ILKEPVHGV)和CMV pp65pos₄₉₅₋₅₀₃(NLVPVMATV)比较,检查PD-L101与HLA-A2结合的能力。PD-L101与HLA-A2结合,其相当于与高亲和力对照表位的结合(图5C)。

[0338] PD-L101对HLA-A2的高结合亲和力使发明人能够产生稳定的HLA-A2/PD-L101四聚体,所述四聚体用来通过流式细胞术检测PDL1-反应性CTL。首先,发明人将来自两位PD-L101响应患者的PBMC用HLA-A2/PD-L101特异性四聚体直接离体染色。这显示,PD-L1-反应性T细胞在这两位患者中均可离体检测(图5D)。在两位患者中,一次体外肽刺激明显地增加PD-L1特异性T细胞的频率。接下来,发明人使用来自这些癌症患者(CM.21和MM.05)的PBMC以体外产生针对这种肽的T细胞大体积培养物。随后,发明人在体外用PD-L101脉冲标记的自体DC刺激来自所述患者的PBMC。在三次体外再刺激后,可检测明显的HLA-A2/PD-L101阳性T细胞。使用来自乳腺癌患者的T细胞获得13.52%的PD-L1-四聚体阳性细胞并且使用来自恶性黑色素瘤患者的T细胞获得0.17%的PD-L1-四聚体阳性细胞(图5D)。

[0339] PD-L1特异性T细胞是CTL

[0340] 使用TAP缺陷型T2细胞作为靶细胞(所述靶细加载有PD-L101或来自HIV的无关对照肽)在标准⁵¹Cr释放测定法中检测PD-L1特异性培养物的溶细胞功能。图6A显示,来自两位不同患者的T细胞培养物高效地溶解以PD-L101脉冲标记的T2-细胞,同时未观察到针对以无关肽脉冲标记的T2-细胞的细胞毒作用。另外,发明人直接添加PD-L101或无关HIV肽至T细胞大体积培养物并通过FACS分析该培养物。这揭示出在添加PD-L101情况下培养物中HLA-A2/PD-L101-四聚体⁺的CD107a⁺细胞的不同群体(图6B)

[0341] 接下来,发明人检查PBMC当中存在的PD-L101特异性T细胞是否直接显示细胞毒功能。因而,使用粒酶B(GrB)ELISPOT,对来自三位黑色素瘤患者(MM.03、MM.53和MM.135)的PBMC分析针对PD-L101的其他反应性,所述患者均携带释放IFN- γ 的PD-L101特异性T细胞。可以在这三位患者(虽然仅两位达到显著性)中以约100-300个释放GrB的PD-L101特异性细胞/5x10⁵个PBMC的频率检测到针对PD-L101的反应(图6C)。

[0342] 针对PD-L1⁺黑色素瘤细胞的溶细胞活性

[0343] 接下来,发明人检查PD-L101特异性CTL杀死PD-L1⁺黑色素瘤细胞MM1312.07和MM.909.06的能力。PD-L101特异性CTL培养物杀死这两种细胞系,不过MM1312.07仅在效应子对靶比率为30:1时被高效杀死(图7A)。CTL培养是高度PDL101特异的。通过FACS检查两种黑色素瘤细胞系MM1312.07和MM.909.06的PD-L1表达。两种细胞系均表达PD-L1,不过MM1312.07仅显示出十分低的表达。IFN- γ 处理增加了两种细胞系中PD-L1的表达(图7B)。与此一致,IFN- γ 处理增加了对两种黑色素瘤细胞系的杀死(图7A)。为增加黑色素瘤细胞

的识别杀死作用,使用偶联有HLA-A2/PD-L101-四聚体的磁珠,发明人富集PD-L101特异性CTL。所产生的CTL培养物由约78%的四聚体阳性细胞组成并以极高效率杀死黑色素瘤细胞系MM1312.07和MM.909.06(图7C)。

[0344] PD-L1依赖性树突细胞溶解

[0345] 可以在免疫细胞中诱导PD-L1。因此,作为下一个且非常更重要的步骤,发明人解决了如下问题:表达PD-L1的成熟DC是否还将易遭PD-L1-反应性CTL杀死。为检验这个观点,发明人从已经从中产生CTL培养物的相同供体产生自体DC;通过添加由IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和PGE₂组成的标准成熟混合物使所述DC成熟。发明人检查了从两位癌症患者产生的两种不同的PD-L101特异性CTL培养物(图8A和8B)。两种CTL培养物均有效地杀死表达PD-L1的成熟DC(mDC)(图8A和8B)。另外,使用不同浓度的PD-L1siRNA,发明人下调自体DC中的PD-L1蛋白表达并因而拯救DC免遭PD-L1特异性CTL培养物杀死(图8A和8B)。作为对照,mDC用中等GC-阴性对照siRNA转染。这些DC遭两种PD-L101特异性T细胞培养物杀死(图8A和8B)。通过四聚体染色法评估杀死mDC的T细胞培养物中PD-L101-四聚体阳性细胞的百分数。使用四聚体复合物HLA-A2/PD-L101-PE/APC和HLA-A2/HIVPE/APC。在杀死DC的T细胞培养物中鉴定到46.92%和71.69%的PD-L101-四聚体阳性细胞(分别是图8A和图8B)。为了在蛋白质水平验证PD-L1的敲减,发明人在siRNA转染后24小时分析mDC上的PD-L1表面表达(图8C)。这些染色证实,使用的PD-L1siRNA以浓度依赖性方式降低细胞中的PD-L1蛋白表达水平(图8C)。引人注目地,杀死效率与DC表达的PD-L1的量相关。

[0346] 非专业抗原呈递细胞以TAP非依赖性方式交叉呈递PD-L1

[0347] 发明人分析了来自PD-L1的两种长多肽;名为“PDL_{1₉₋₂₈}”的PDL_{1₉₋₂₈}(FMTYWHLLNAFTVTVPKDL)和名为“PDL_{1₂₄₂₋₂₆₄}”的PDL_{1₂₄₂₋₂₆₄},VILGAILLCLGVALTFIFRLRKKG)。仅前者(PDL_{1₉₋₂₈})包含PD-L101的序列PDL_{1₁₅₋₂₃};LLNAFTVTV)。再次针对HLA-A2⁺EBV转化的B-细胞系KIG-BCL检验PD-L101特异性CTL,其中所述KIG-BCL用PD-L101,PDL_{1₉₋₂₈}、PDL_{1₂₄₂₋₂₆₄}或无关HIV肽脉冲标记。不仅用最小PD-L101肽脉冲标记、而且用PDL_{1₉₋₂₈}肽脉冲标记的B细胞被PD-L101特异性CTL识别,而用PDL_{1₂₄₂₋₂₆₄}或HIV对照肽脉冲标记的B细胞未遭杀死(图9A)。KIG-BCL细胞不表达PD-L1(图9D)。类似地,发明人检查T2-细胞交叉呈递长PD-L1肽的能力。因而,再次针对T2-细胞检验PD-L101特异性CTL,其中所述T2-细胞用PD-L101、PDL_{1₉₋₂₈}、PDL_{1₂₄₂₋₂₆₄}或HIV肽脉冲标记。尽管T2细胞中不存在TAP转运蛋白,但是PDL_{1₉₋₂₈}肽被T2-细胞高效地呈递,因为它们被PD-L101特异性CTL杀死(图9B)。这种杀死是HLA-A2限制性的,因为它可以通过添加抗-HLA-A2抗体阻断(图9C)。T2-细胞不表达PD-L1(图9D)。最后,发明人评估了PD-L101特异性CTL是否识别用全长蛋白质脉冲标记至少3小时的KIG-BCL或T2细胞。KIG-BCL明显地不能够交叉呈递全长蛋白质,因为这些细胞未被识别(图9)。然而令人惊讶地,用全长蛋白质脉冲标记的T2-细胞被PD-L101-特异性CTL识别和杀死(图9B)。因此,T2-细胞不仅能够摄取、加工和呈递PDL_{1₉₋₂₈},还能够摄取、加工和呈递全长重组PD-L1蛋白。

[0348] 实施例4

[0349] 为研究用PD-L1肽共刺激是否将强化针对病毒和肿瘤相关抗原的T细胞反应性,进行以下实验的任一个。

[0350] 与自体PD-L1特异性T细胞共培养

[0351] 用50 μ g/ml病毒肽(CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)、CMV IE1₃₁₆₋₃₂₄(VLEETSVML)或Flu

基质 p_{58-66} (GILGFVFTL)体外刺激PBMC。在第2日和第6日添加40U/mL IL-2。将PBMC单独培养或在第6日添加PD-L1特异性自体T细胞(按PBMC对PD-L1特异性T细胞比率2000:1)。在第9日,将培养物用120U/mL IL-2刺激。在培养12日后,通过MHC-四聚体染色比较单独培养或添加PD-L1特异性T细胞时培养的培养物中病毒特异性T细胞的数目。还比较了培养物中Tregs、产生IL-17A的T细胞的数目和CD4/CD8细胞比率。作为对照,将PBMC与具有无关特异性的自体CD8⁺T细胞共培养。

[0352] 用PD-L1肽共刺激

[0353] 在25μg/ml PD-L1肽或无关肽(HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄(ILKEPVHGV))共培养的情况下,用25μg/ml病毒或肿瘤相关抗原(CMV pp65₄₉₅₋₅₀₃(NLVPMVATV)、CMV IE1₃₁₆₋₃₂₄(VLEETSVML)或MART-1₂₆₋₃₅(EAAGIGILTV))在体外刺激PBMC。每隔2日添加40U/mL IL-2。每7日,将培养物分别用CMV肽或MART-1肽与PD-L1肽的混合物或CMV肽或MART-1肽与HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄肽的混合物刺激。对于第二次,第三次和第四次肽刺激,分别用10倍、100倍和1000倍稀释的肽刺激细胞。在3至4次刺激后,通过MHC-四聚体染色比较与PD-L1肽或HIV-1pol₄₇₆₋₄₈₄肽共培养的培养物中CMV特异性或MART-1特异性T细胞的数目。还比较了培养物中Tregs、产生IL-17A的T细胞的数目和CD4/CD8细胞比率。

序列表

<110> 海莱鸟医院

<120> 基于PD-L1的免疫疗法

<130> P2740DK00

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

[0001] Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270

[0002]

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 2

Leu Leu Asn Ala Phe Thr Val Thr Val
 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> PD-L1肽

<400> 3

Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> PD-L1肽

<400> 4

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

[0003] <220>
<223> PD-L1肽

<400> 5

Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> PD-L1肽

<400> 6

Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 7

Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 8

Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0004] <223> PD-L1肽

<400> 9

Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 10

His Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 11

Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 12

Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

[0005]

<400> 13

Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 14

Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile
1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 15

Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 16

His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu
1 5 10

<210> 17

<211> 10

[0006] <212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 17

Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD-L1肽

<400> 18

Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val
1 5 10

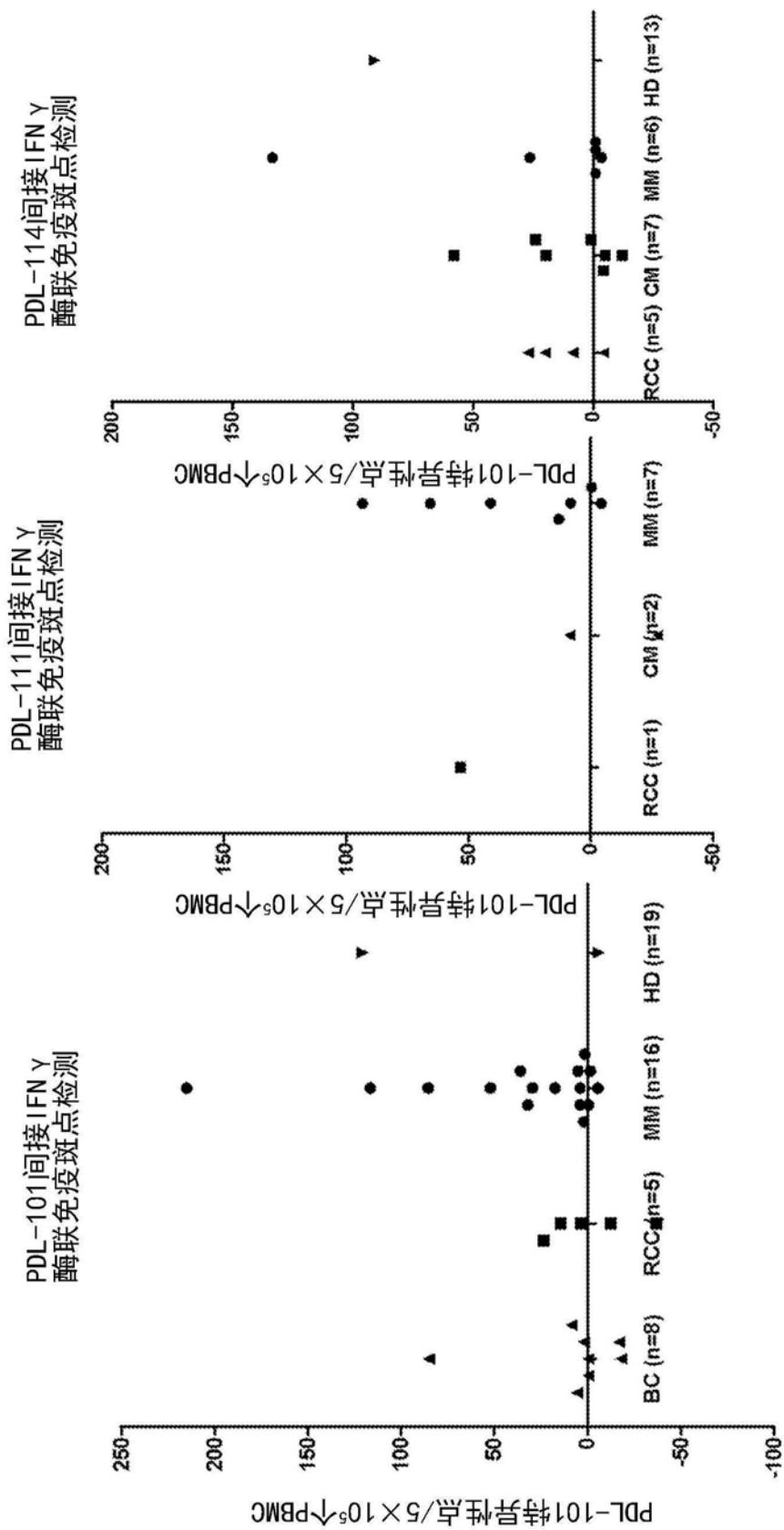


图1

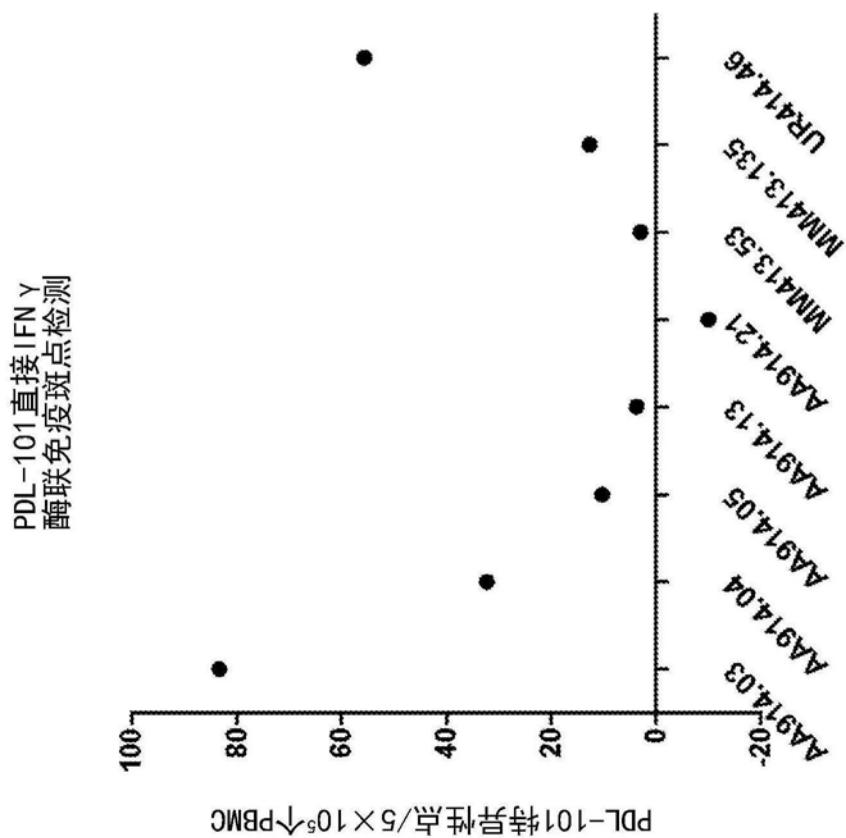


图2A

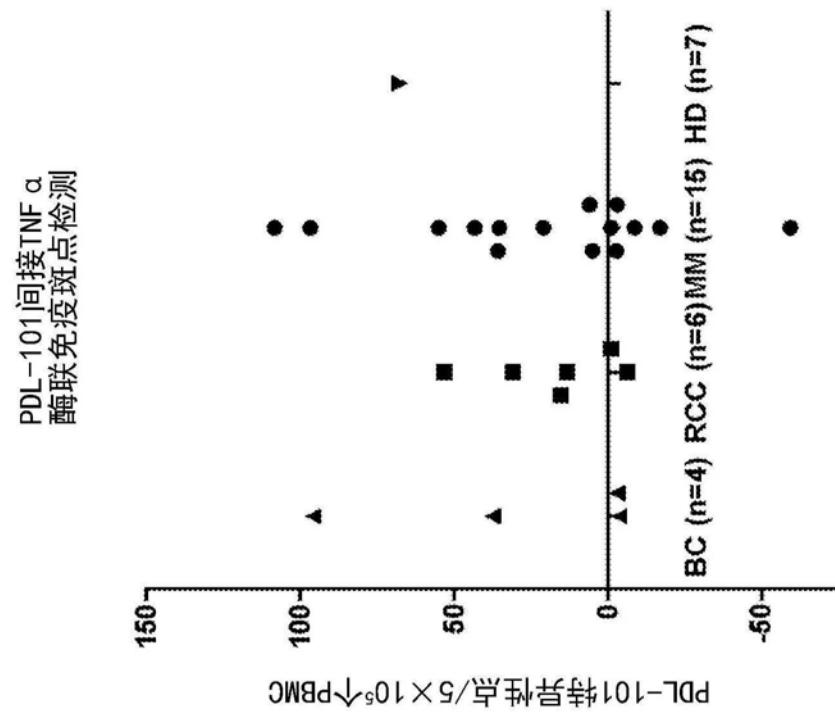


图2B

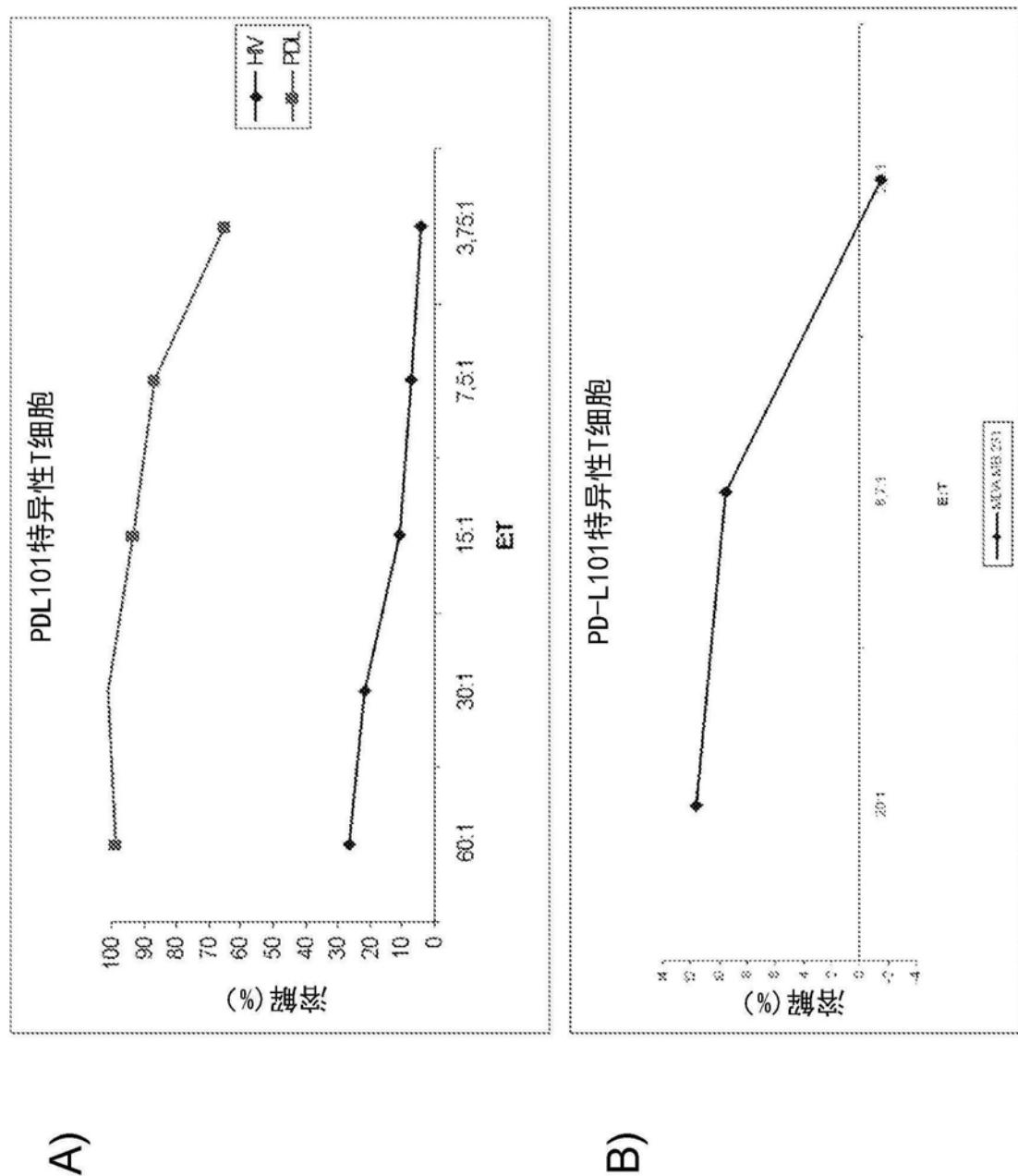


图3

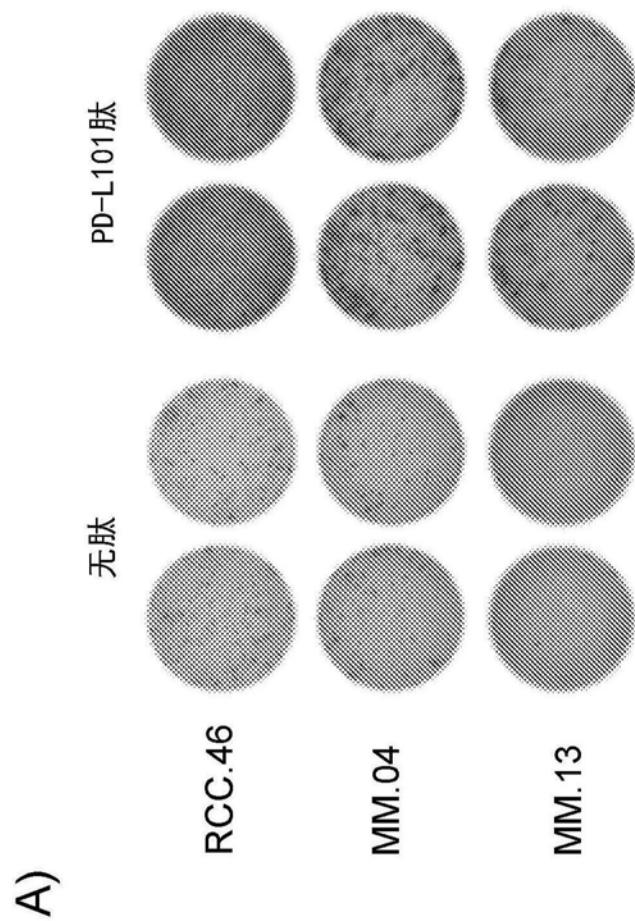
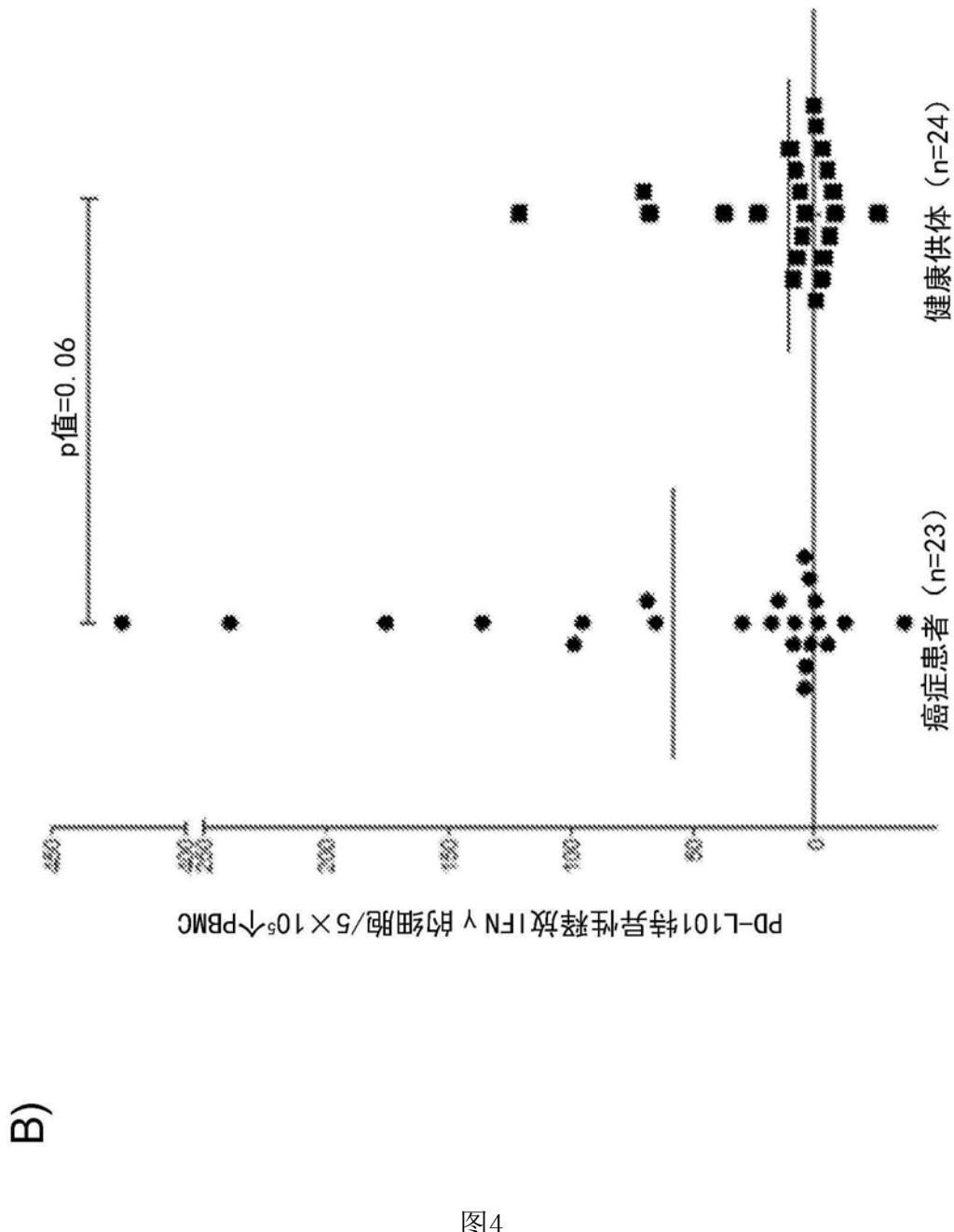
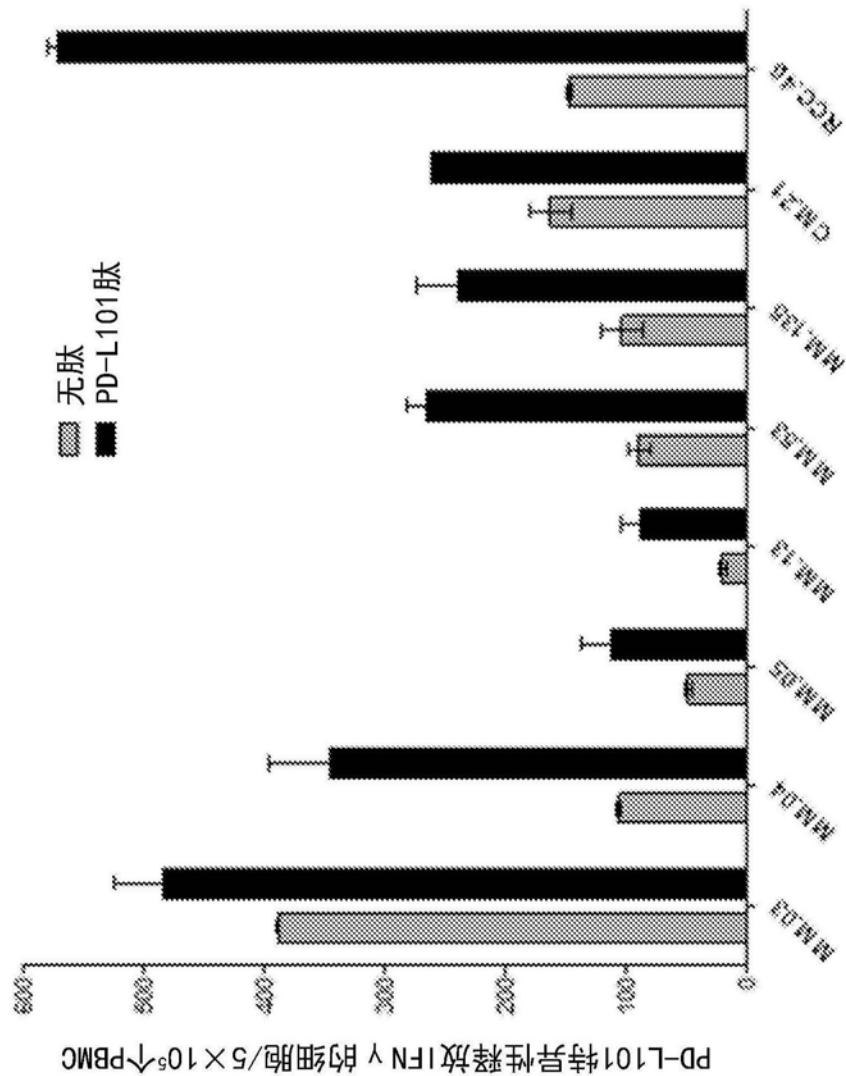


图4



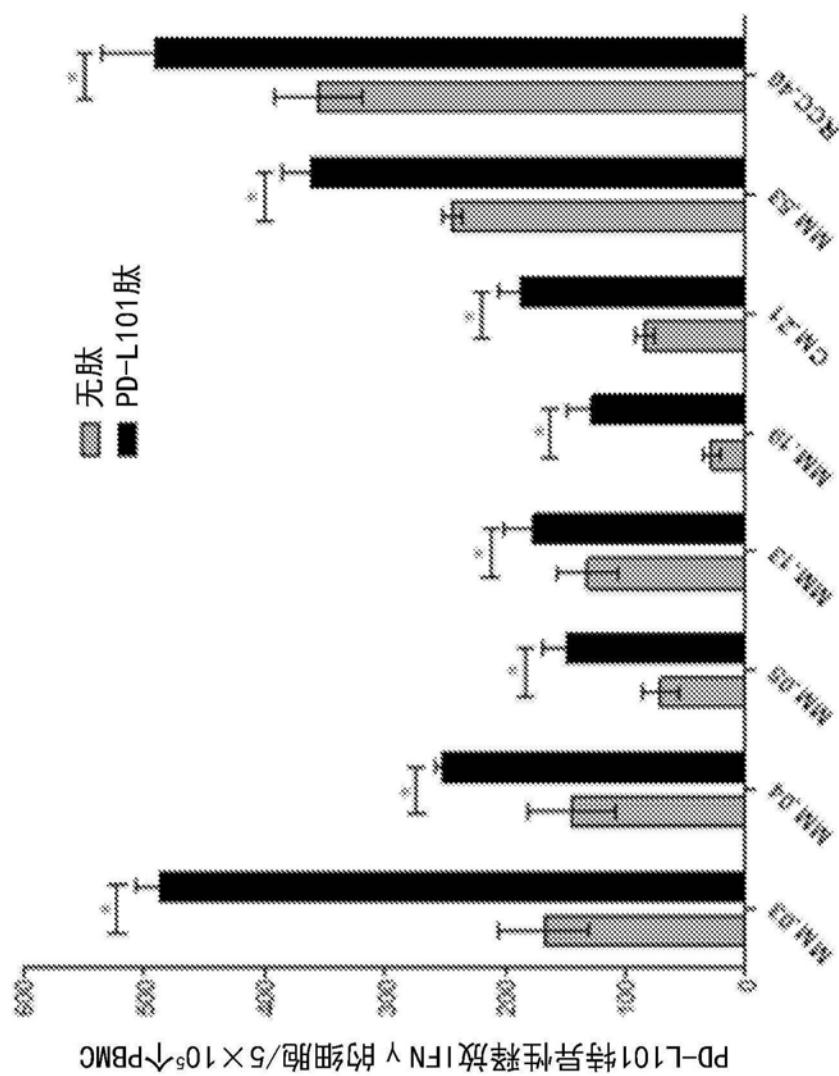
B)

图4



C)

图4



D)

图4

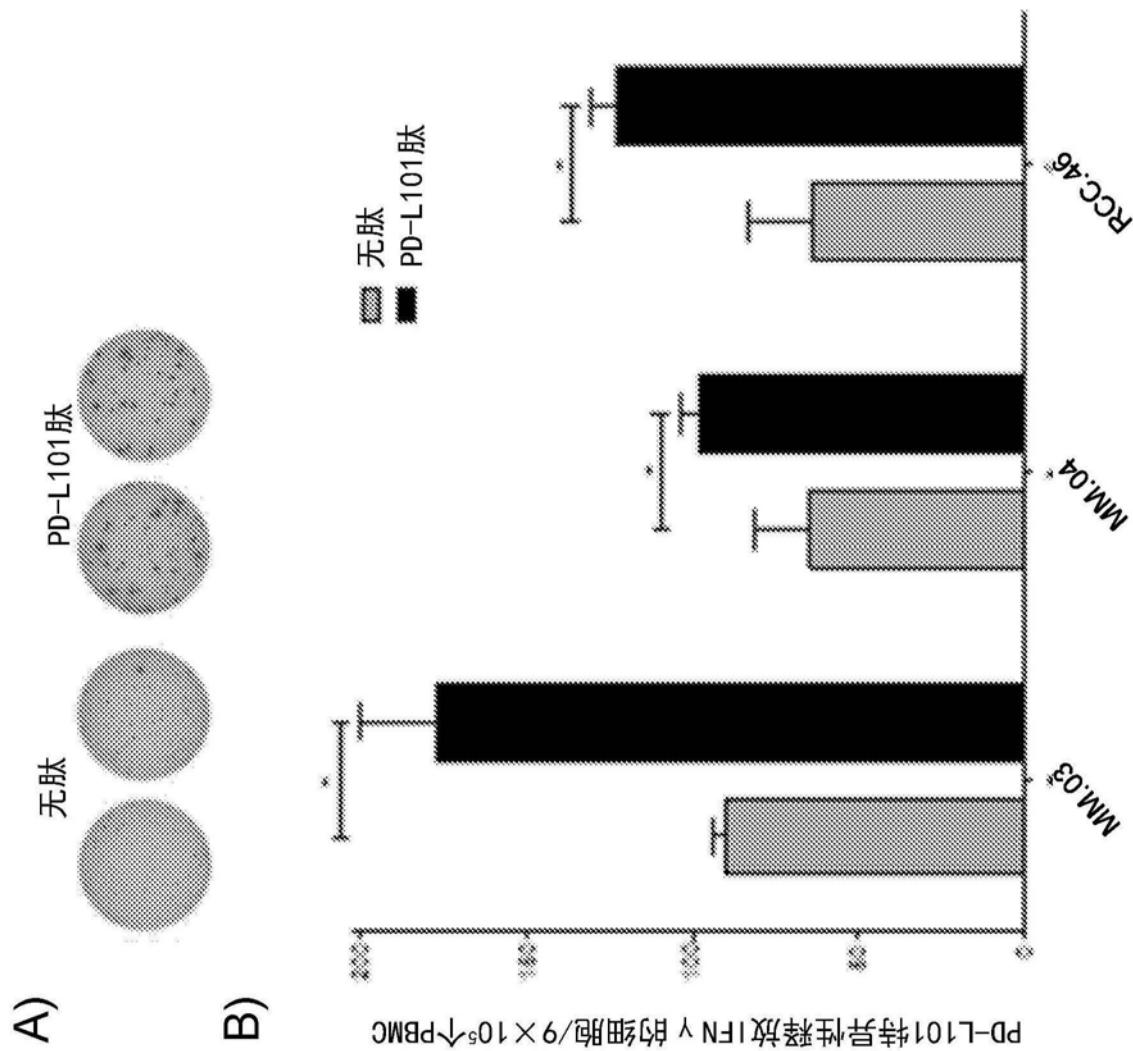
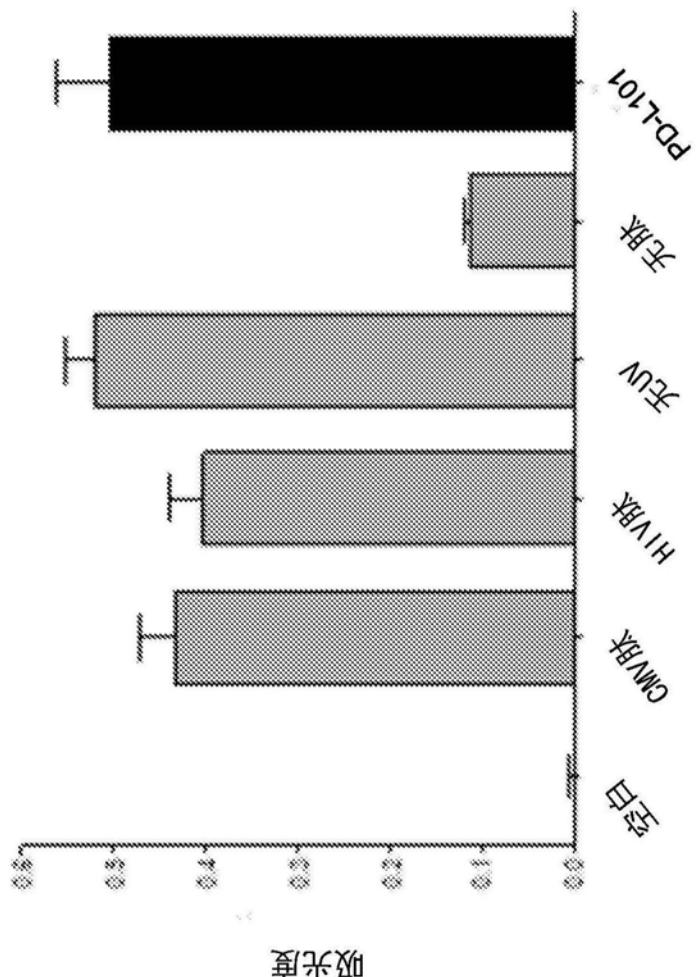
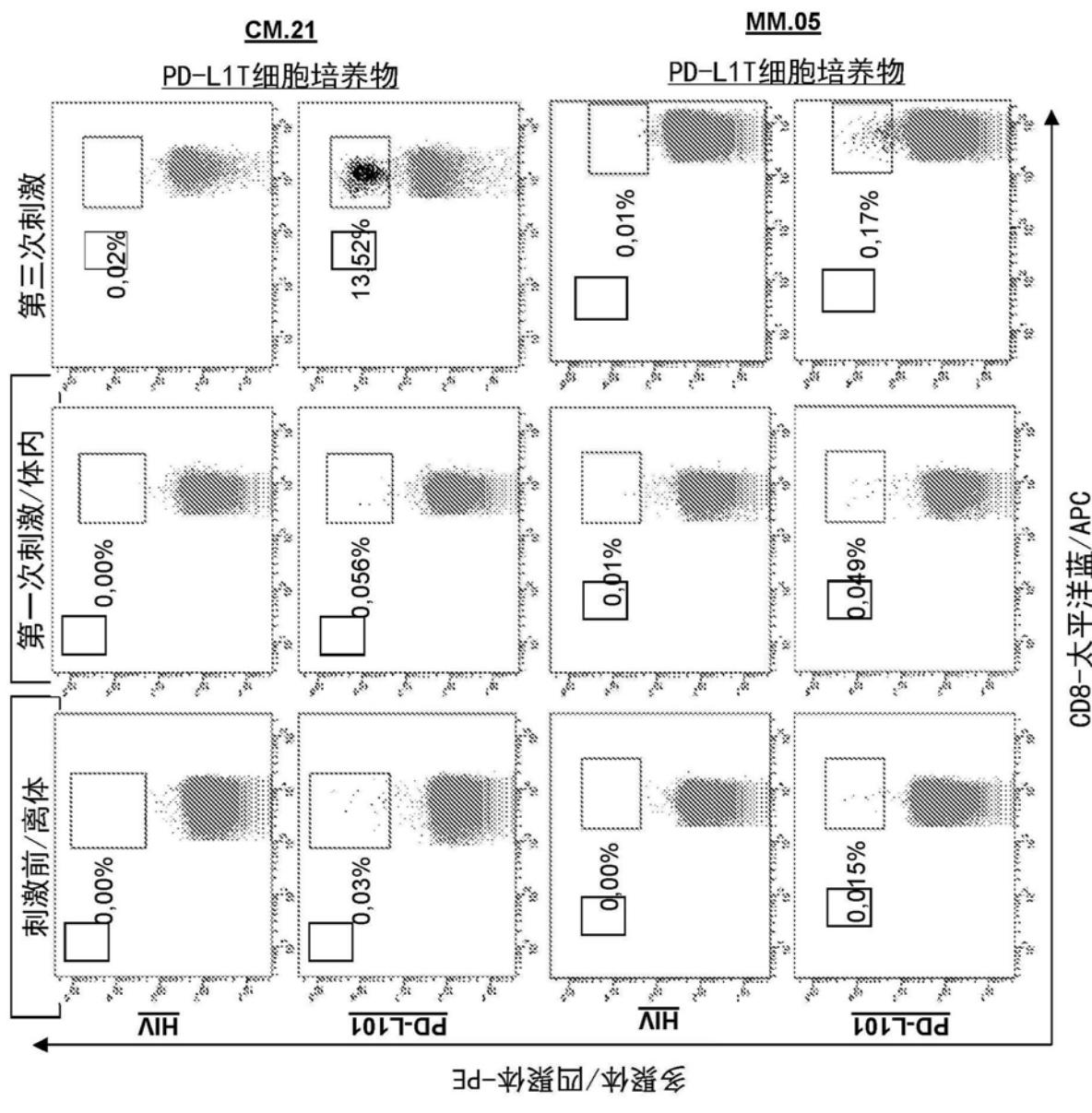


图5



C)

图5



D)

图5

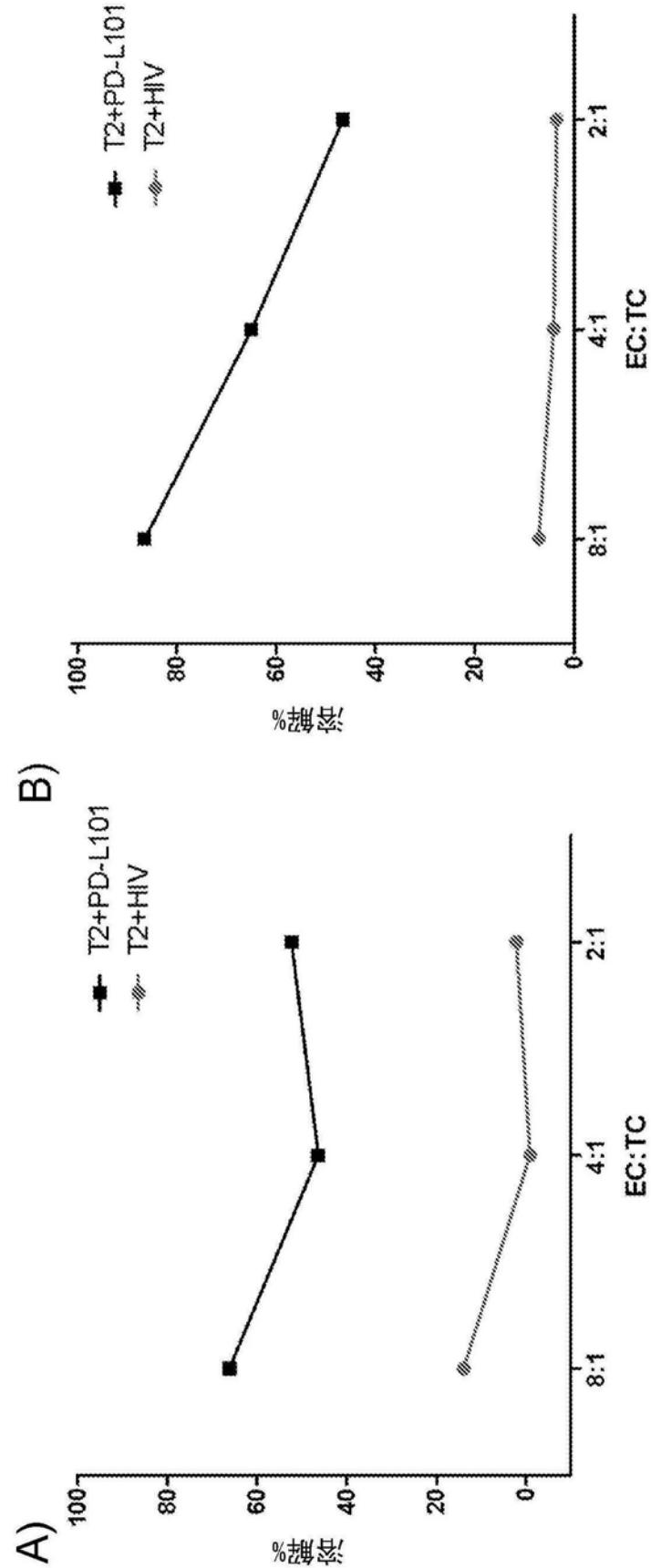
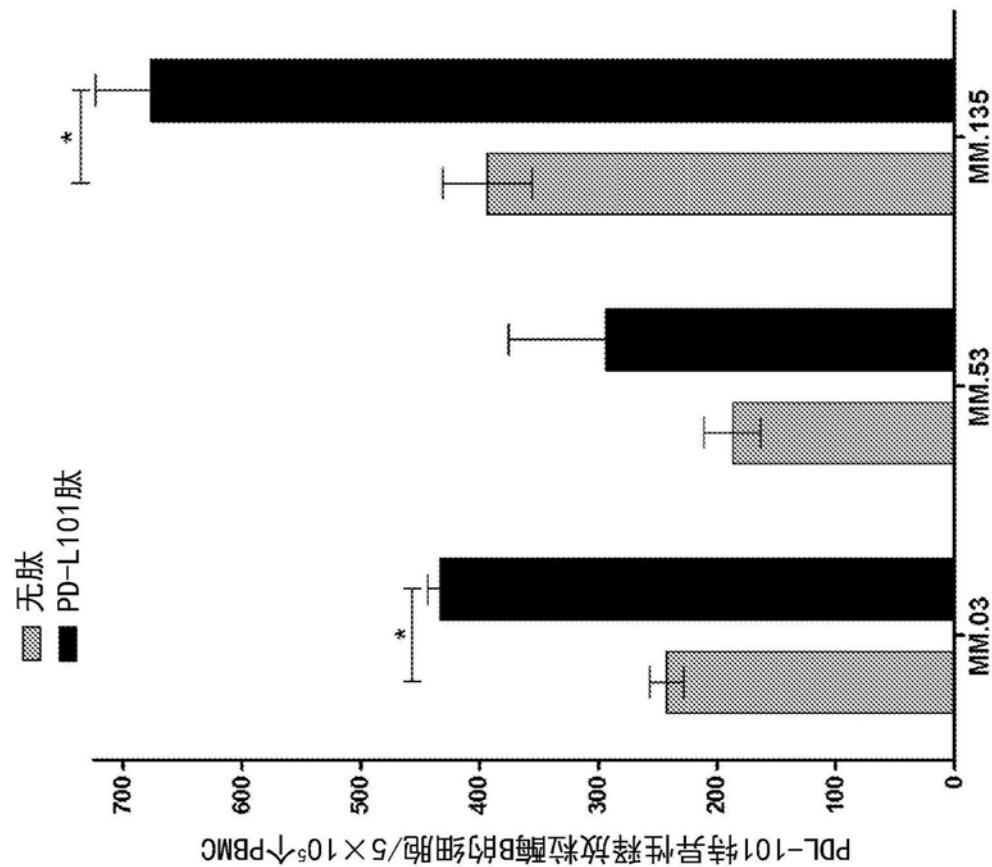


图6



C)

图6

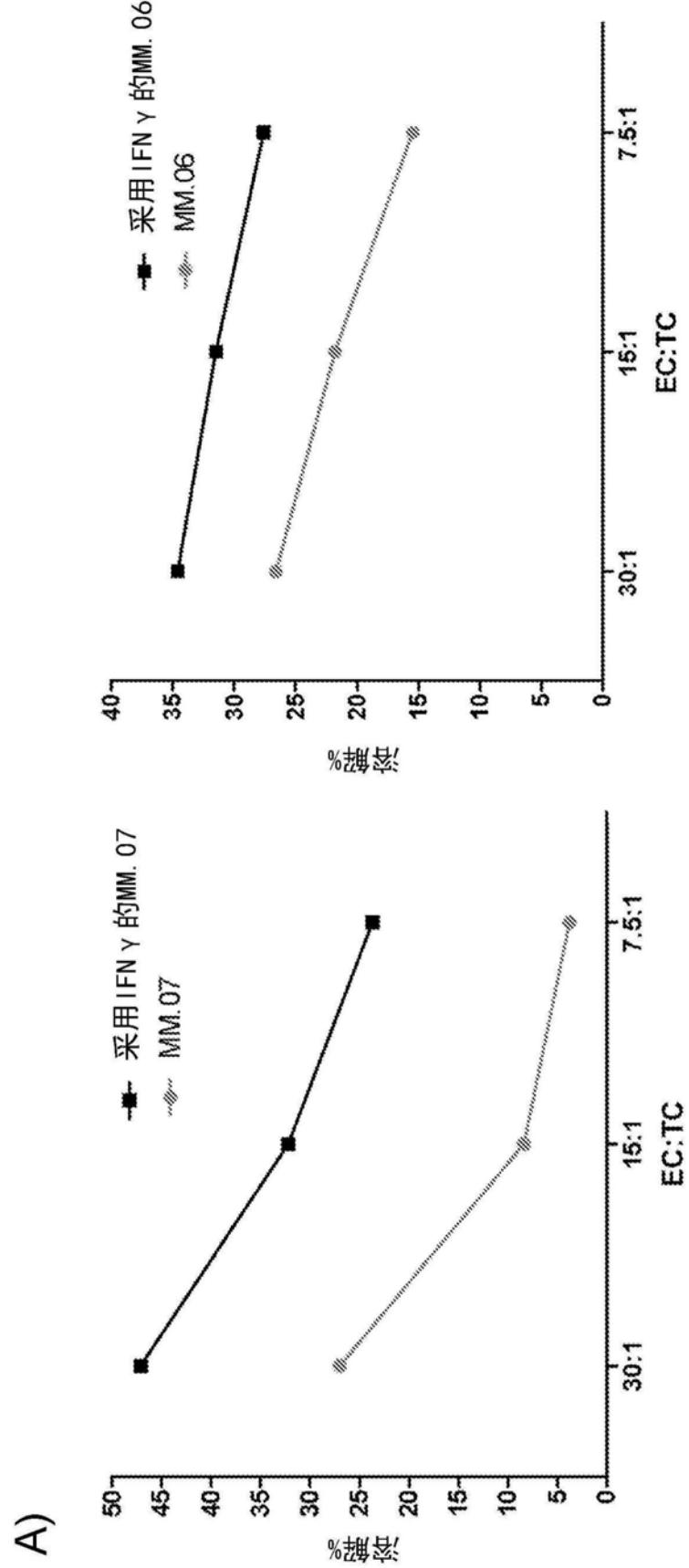


图7

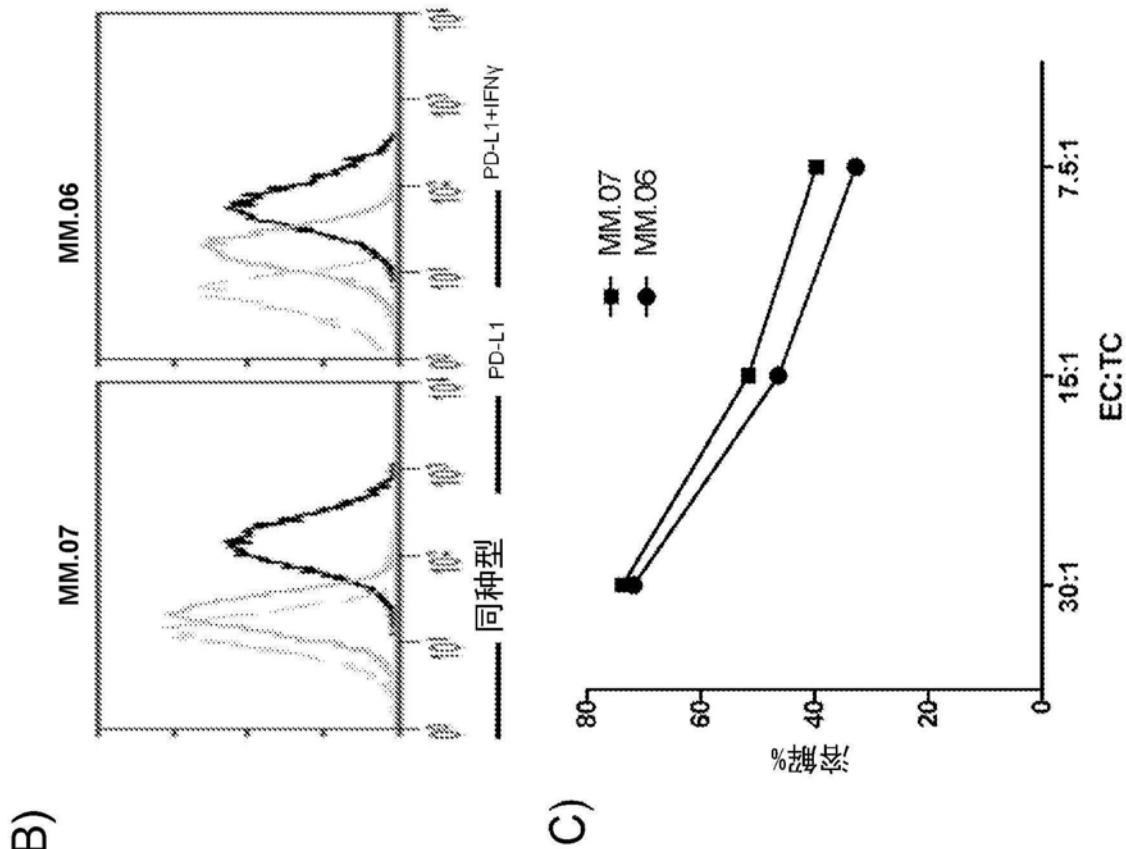


图7

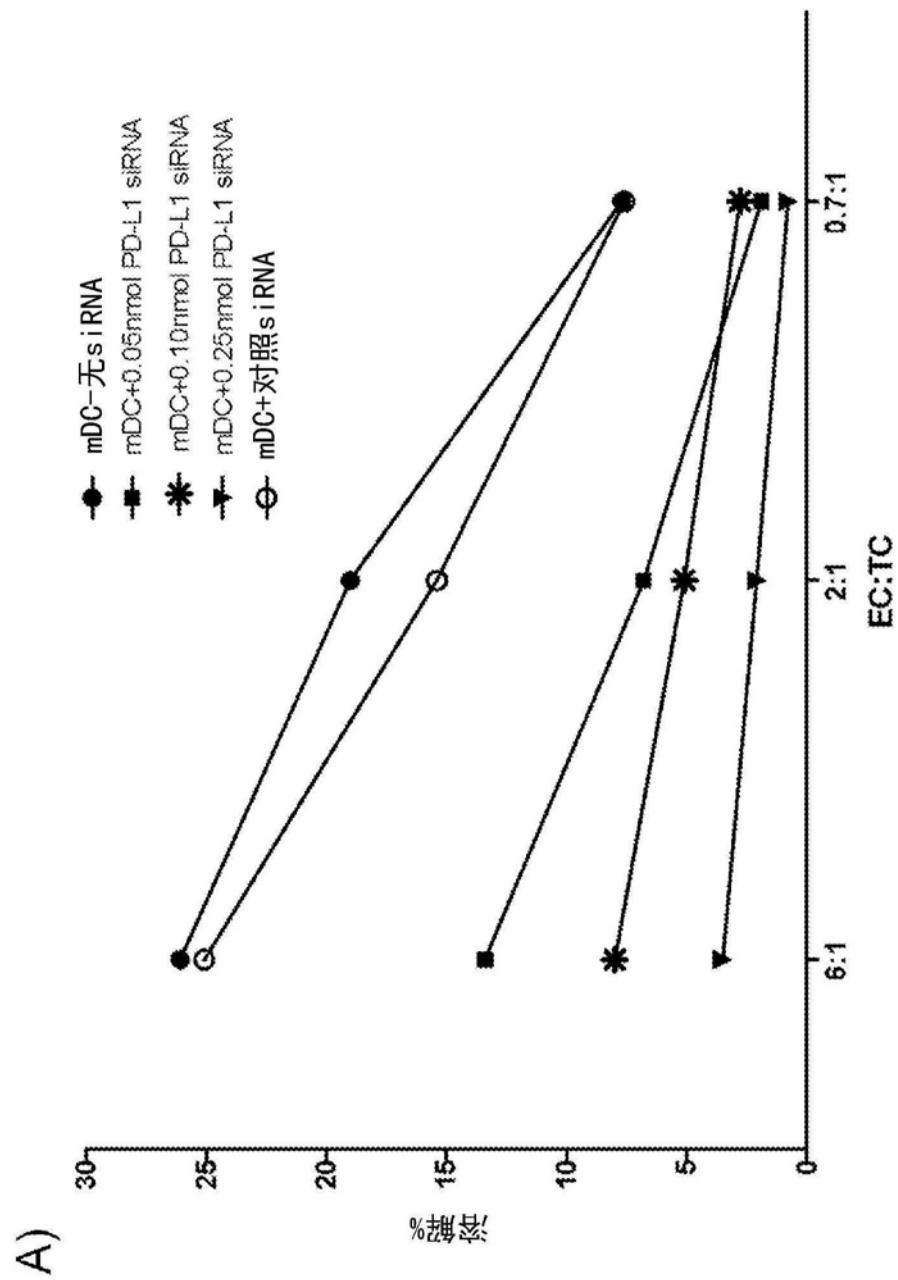


图8

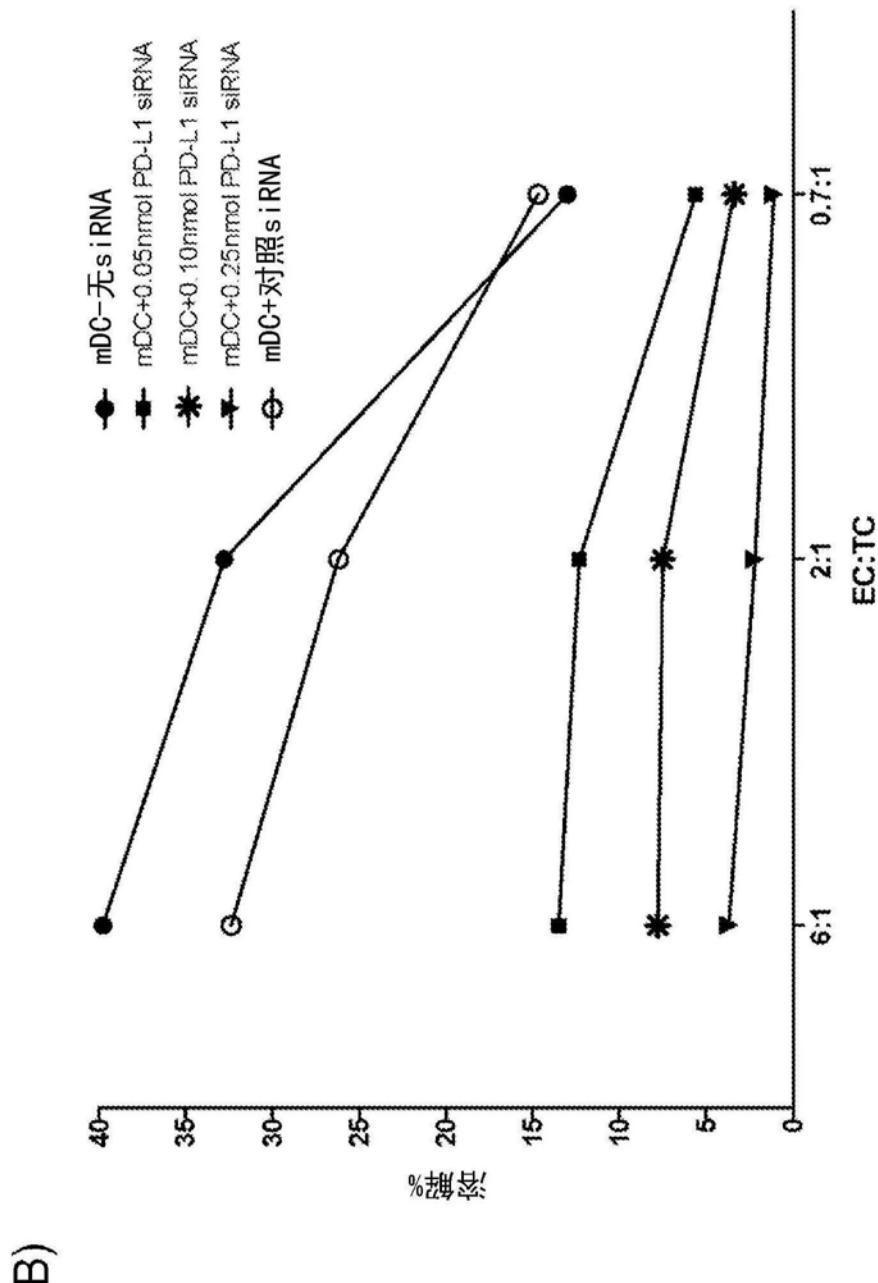


图8

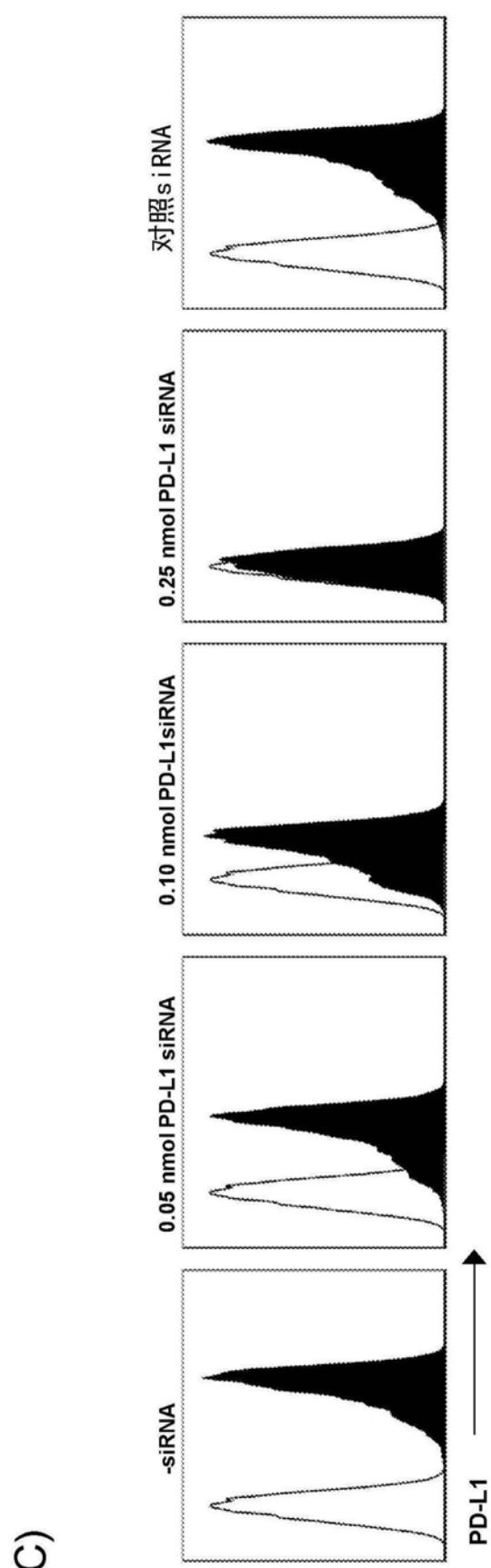


图8

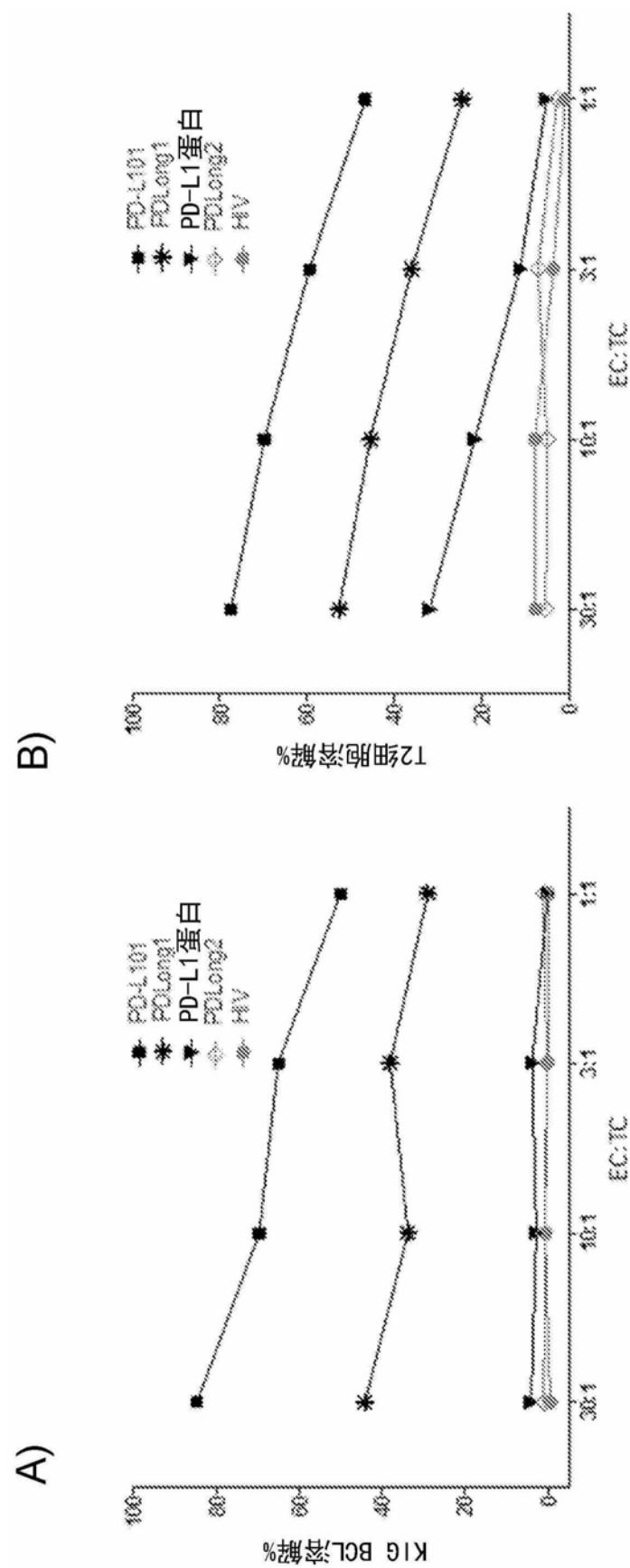


图9

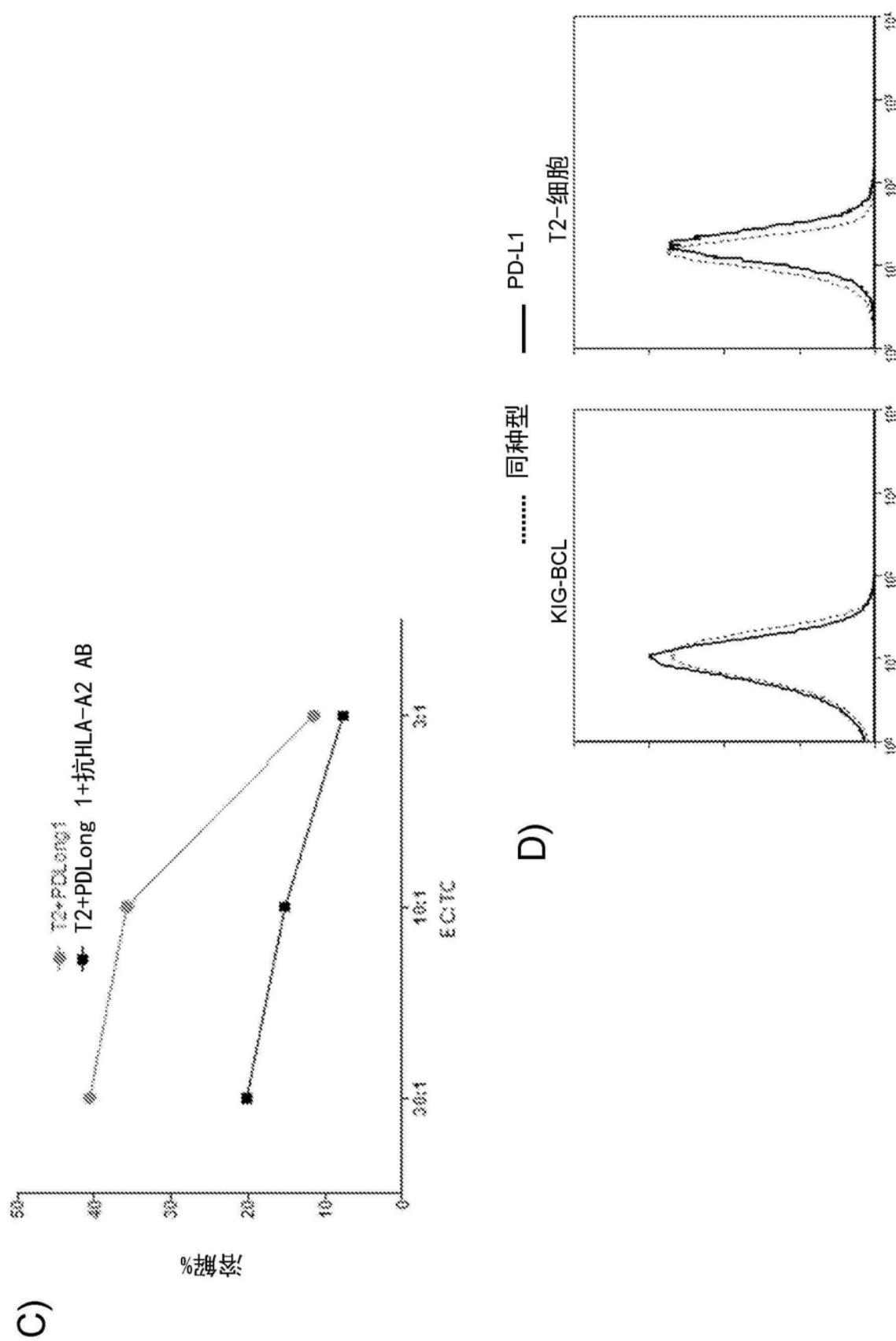


图9