



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107406857 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201680014846.8

(22) 申请日 2016.01.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107406857 A

(43) 申请公布日 2017.11.28

(30) 优先权数据
62/101,969 2015.01.09 US
62/150,236 2015.04.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/012496 2016.01.07

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2016/112195 EN 2016.07.14

(73) 专利权人 埃图比克斯公司
地址 美国华盛顿州
专利权人 弗兰克·R·琼斯
伊丽莎白·加比茨施
伊薇特·拉驰曼
阿德里安·赖斯

(72) 发明人 弗兰克·R·琼斯
伊丽莎白·加比茨施
伊薇特·拉驰曼 阿德里安·赖斯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51) Int.Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 39/235 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2014031178 A1, 2014.02.27
WO 2005058950 A2, 2005.06.30
US 2012/0107347 A1, 2012.05.03
E S.Gabitzsch et al..The generation and analyses of a novel combination of recombinant adenovirus vaccines targeting three tumor antigens as an immunotherapeutic.《Oncotarget》.2015,第6卷(第31期),
Michael A. Morse et al..Novel adenoviral vector induces T-cell responses despite anti-adenoviral neutralizing antibodies in colorectal cancer patients.《Cancer Immunol Immunother》.2013,

审查员 马俊凯

权利要求书4页 说明书97页
序列表68页 附图47页

(54) 发明名称

用于联合免疫治疗的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于使用腺病毒载体产生免疫应答的方法,该方法允许使用相同腺病毒载体进行多次疫苗接种以及在具有预先存在的对腺病毒的免疫力的个体中进行疫苗接种。

1. 一种组合物,其包含:

(a) 重组复制缺陷型5型腺病毒载体,其含有E2b基因区的缺失、E1基因区的缺失以及编码如SEQ ID NO:9所示的MUC1抗原的核苷酸序列;

(b) 重组复制缺陷型5型腺病毒载体,其含有E2b基因区的缺失、E1基因区的缺失以及如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的编码Brachyury抗原的核苷酸序列;以及

(c) 重组复制缺陷型5型腺病毒载体,其含有E2b基因区的缺失、E1基因区的缺失以及编码如SEQ ID NO:10所示的CEA抗原的核苷酸序列,

其中所述MUC1抗原是MUC1-C抗原,并且其中(a)、(b)和(c)按病毒载体以1:1:1的比例存在。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述编码所述Brachyury抗原的核苷酸序列是SEQ ID NO:7。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述编码所述Brachyury抗原的核苷酸序列是SEQ ID NO:8。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中在被施用所述组合物的受试者中诱导了针对所述MUC-1抗原、所述Brachyury抗原或所述CEA抗原或表达所述MUC-1抗原、所述Brachyury抗原或所述CEA抗原的细胞的免疫应答,其中所述受试者患有癌症。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫应答包括针对所述抗原的抗体的产生。

6. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫应答包括细胞介导的免疫(CMI)。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述编码CEA抗原的序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少80%的序列同一性。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)中的每一个还包含E3基因区的缺失、E4基因区的缺失、或其组合。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)影响其所携带的抗原在转染的细胞中的过表达。

10. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述受试者中针对表达所述MUC-1抗原、所述Brachyury抗原或所述CEA抗原的所述免疫应答是基线的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述受试者具有大于50、75、100、125、150、160、175或200的逆Ad5中和抗体滴度。

12. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述受试者具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。

13. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为抗原特异性抗体应答。

14. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。

15. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为抗原特异性IFN- γ 分泌。

16. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述免疫应答被测量为抗原特异性IL-2分泌。

17. 根据权利要求4所述的组合物,其中通过ELISpot测定来测量针对所述抗原的免疫应答。

18. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。

19. 根据权利要求4所述的组合物,其中通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自肿瘤细胞系或自体肿瘤的表达同种异体抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。

20. 根据权利要求1所述的组合物,进一步包含免疫原性组分。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。

22. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

23. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述CEA抗原包含含有在与SEQ ID NO:3中的位置610对应的位置的天冬氨酸的置换的修饰。

24. 根据权利要求1所述的组合物,进一步包含含有免疫途径检查点调节剂的分子组合物。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述免疫途径检查点调节剂激活或加强免疫应答。

26. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述免疫途径检查点抑制免疫应答。

27. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述免疫途径检查点调节剂靶向选自下组的内源性免疫途径检查点蛋白或其片段:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RPI、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3、GAL9、ADORA、CD276、VTCN1、IDO1、KIR3DL1、HAVCR2、VISTA和CD244。

28. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述免疫途径检查点调节剂靶向PD1蛋白。

29. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述分子组合物包含siRNA、模拟物、重组形式的配体、重组形式的受体、抗体或其组合。

30. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述组合物包含至少 5×10^{11} 个所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)的病毒颗粒、至少 5×10^{11} 个所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(b)的病毒颗粒和至少 5×10^{11} 个所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(c)的病毒颗粒。

31. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述施用包含皮下施用。

32. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述癌症是结肠直肠癌腺癌、转移性结肠直肠癌、晚期MUC1-C、表达Brachyury或CEA的结肠直肠癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌或胰腺癌。

33. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述受试者是人。

34. 权利要求1-33中任一项所述的组合物在制备用于治疗人的癌症或传染病的药物中的用途,其中所述药物被施用至所述人。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中所述施用被重复至少一次。

36. 根据权利要求34所述的用途,其中所述施用在前一施用步骤后约2、3、4、5或6周后被重复。

37. 根据权利要求34所述的用途,其中所述施用在前一施用步骤后约2、3、4、5或6个月后被重复。

38. 根据权利要求34所述的用途,其中所述施用被重复两次。

39. 根据权利要求34所述的用途,其中重组缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)感染所述人中的树突细胞,并且其中感染的树突细胞呈递所述抗原,从而诱导所述免疫应答。

40. 根据权利要求34所述的用途,其中所述施用包括皮下(sc)施用。

41. 根据权利要求34所述的用途,其中在所述施用步骤之前,所述人携带大于50、75、100、125、150、160、175、200、225、250、275或300的逆Ad5中和抗体滴度。

42. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。

43. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人不同时通过类固醇、皮质类固醇和免疫抑制剂中的任一种进行治疗。

44. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人没有自身免疫病。

45. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人没有炎性肠病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性硬化、病毒性肝炎或HIV。

46. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人患有或将来可能患有感染性疾病。

47. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人患有自身免疫相关甲状腺疾病或白癜风。

48. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人患有或将来可能患有增殖性疾病癌症。

49. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人患有结肠直肠癌腺癌、转移性结肠直肠癌、晚期MUC1-C、表达Brachyury或CEA的结肠直肠癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌或胰腺癌。

50. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有至少1、2或3个转移性疾病部位。

51. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人包含过表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞。

52. 根据权利要求51所述的用途,其中相对于非癌细胞中的基线MUC1-C、Brachyury或CEA表达,所述过表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞将所述MUC1-C、Brachyury或CEA过表达了至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

53. 根据权利要求51所述的用途,其中过表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞包括癌细胞。

54. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有诊断的疾病倾向。

55. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人患有稳定的疾病。

56. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有疾病的遗传倾向。

57. 根据权利要求54所述的用途,其中所述疾病为癌症。

58. 根据权利要求57所述的用途,其中所述癌症选自前列腺癌、结肠癌、乳腺癌或胃癌。

59. 根据权利要求58所述的用途,其中所述癌症为前列腺癌。

60. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有6或更少的格里森得分。

61. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有大于6的格里森得分。

62. 一种用于诱导人中的免疫应答的试剂盒,该试剂盒包含:

(i) 权利要求1-33中任一项所述的组合物,包含在0.8-1.2mL范围内的体积的治疗性溶液,所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各至少 1.0×10^{11} 个;

(ii) 包含分子组合物的治疗性溶液的组合物,该分子组合物包含免疫途径检查点调节剂;以及

(iii)说明书。

63.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $1.0-5.5 \times 10^{11}$ 个。

64.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)、(b)或(c)能够影响修饰的MUC1-C、Brachyury或CEA在感染的细胞中的过表达。

65.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)分别在人中诱导对表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞的特异性免疫应答。

66.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述免疫途径检查点调节剂靶向选自下组的内源性免疫途径检查点蛋白或其片段:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RP1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3、GAL9、ADORA、CD276、VTCN1、IDO1、KIR3DL1、HAVCR2、VISTA和CD244。

67.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述分子组合物包含siRNA、模拟物、重组形式的配体、重组形式的受体、抗体或其组合。

68.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述说明书针对增殖性疾病或癌症的治疗。

69.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述说明书针对感染性疾病的治疗。

70.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各至少 1.0×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个。

71.根据权利要求62所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个。

72.根据权利要求70或71所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 或 $1.0-5.5 \times 10^{11}$ 个。

73.根据权利要求70或71所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个。

74.根据权利要求70或71所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个。

75.根据权利要求70或71所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个。

76.根据权利要求70或71所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个。

77.根据权利要求70或71所述的试剂盒,其中所述治疗性溶液包含重组复制缺陷型5型腺病毒载体(a)-(c)的每一个的病毒颗粒各 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个。

78.根据权利要求62所述的试剂盒,其中进一步包含免疫原性组分。

79.根据权利要求78所述的试剂盒,其中所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。

80.根据权利要求78所述的试剂盒,其中所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

用于联合免疫治疗的方法和组合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年1月9日提交的美国临时申请号62/101,969和于2015年4月20日提交的美国临时申请号62/150,236的优先权,这些申请通过引用而整体并入本文。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请涉及于2013年3月15日提交的PCT申请号PCT/US2013/032688,该申请的内容通过引用而整体并入于此。

[0005] 关于联邦政府赞助研究的声明

[0006] 本发明是根据美国国家癌症研究所 (NCI) 授予的合同号HHSN 261200900059C;和 NCI授予的合同号HHSN 261201100097C;NCI授予的批准号1R43CA134063;NCI授予的批准号2R44CA134063;NCI授予的批准号1R43CA186357;美国国立牙科与颅面研究所 (NIDCR) 授予的批准号1R43DE021973;以及NIDCR授予的批准号2R44DE021973在政府支持下做出的。政府可享有本发明的某些权利。

背景技术

[0007] 疫苗通过训练免疫系统识别并破坏有害物质和病变细胞来帮助身体抵抗疾病。疫苗可大致分为预防疫苗和治疗疫苗两种类型。将预防疫苗给予健康的人,以防止特定疾病的发展,而将治疗疫苗(也称为免疫治疗)给予被诊断出患有疾病的人,以帮助阻止该疾病的发展和扩散或作为预防性的。目前正在开发病毒疫苗以帮助抵抗感染性疾病和癌症。这些病毒疫苗通过诱导与宿主细胞内的疾病相关联的基因的一小部分的表达而起作用,这继而强化宿主的免疫系统以鉴定并破坏病变细胞。因此,病毒疫苗的临床反应可取决于疫苗获得高水平免疫原性和具有持续长期的表达的能力。免疫检查点如免疫抑制途径可在调节潜在免疫原性的生理学免疫应答的持续时间和幅度方面发挥关键作用。通过将疫苗的施用与抑制免疫检查点免疫抑制途径的药物相组合,可以能够增强疫苗在患者中的功效和有效性。

[0008] 通过递送肿瘤相关抗原 (TAA) 实现的癌症免疫治疗可具有存活期益处;然而,存在对这些策略的限制,并且需要更多的免疫有效的疫苗。已经采用了包括佐剂和免疫刺激细胞因子共同施用在内的多种疫苗接种策略来解决自身肿瘤抗原的低免疫原性。替代方案包括使用内在地提供先天性促炎信号并表达感兴趣的抗原的重组病毒载体。基于腺病毒血清型-5 (Ad5) 的免疫治疗剂已被反复用于人类中,以诱导稳定的T细胞介导的免疫 (CMI) 应答,同时保持安全。尽管Ad5载体已经大量生产,并且对于门诊施用的储存和递送是稳定的,但使用第一代 (E1缺失型) 基于Ad5的载体的主要障碍在于高频率的预先存在的抗Ad5中和抗体 (NAbs,其可存在于来自先前野生型腺病毒感染的宿主中),或者通过重复注射基于Ad5的疫苗而对Ad5 NAbs的诱导,每种均导致对靶TAA的免疫刺激不充足。

[0009] 采用腺病毒 (Ad) 载体的主要问题在于它们无法维持长期的转基因表达,这主要是由于宿主免疫应答消除了有免疫能力的受试者中的Ad载体和病毒转导细胞。第一代Ad载体疫苗的使用受到预先存在的或诱导的疫苗对Ad的免疫力的严重限制。大多数人具有Ad5

NAb,并且三分之二具有针对Ad的淋巴增殖反应。携带HIV-1包膜基因的Ad载体疫苗不能在佐剂的情况下使用DNA再次免疫初次免疫应答。非人灵长类动物的单次免疫不能生成针对HIV蛋白的转基因特异性抗体,或改变总体T细胞应答。

[0010] 存在预先存在的免疫力干扰Ad载体疫苗的许多机制,但一个主要关注的问题是,在Ad感染的携带抗原的细胞的CMI消除之前存在NAb。这两种应答都可针对数种Ad蛋白。尽管增加疫苗剂量可使Ad免疫动物中对期望的CMI应答的诱导增加,但在动物和人类中产生通常不能接受的不良反应。使用第一代Ad5载体(使用裸(非载体的)DNA作为引发疫苗接种的异源初次-加强方案),然后进行Ad5载体免疫可导致针对Ad5的后续免疫应答,从而使得不能用使用了相同病毒骨架的相同(或不同)Ad载体疫苗施用进一步的再免疫(增强)。因此,使用采用了当前第一代Ad5载体的这种方法可取消Ad5载体免疫的进一步使用。

[0011] 第一代(E1缺失型)Ad载体疫苗表达Ad晚期基因,尽管是以比野生型Ad病毒更低的水平且在更长的时间段内进行表达,并且疫苗抗原与高度免疫原性的Ad衣壳蛋白同时呈递给免疫系统。由于抗原竞争,产生的免疫应答不太可能针对期望的疫苗表位,而是更可能针对Ad衍生的抗原。基于Ad5的载体面临的主要问题之一是人类群体中预先存在的对Ad的免疫力的高倾向,以及对于任何其他疫苗应用,这种高倾向如何可阻碍常规Ad5[E1-]缺失型(第一代Ad)在大多数人类群体中的使用。使用第一代(E1缺失型)基于Ad5的载体的主要障碍在于高频率的预先存在的抗5型腺病毒中和抗体。这些抗体可由于先前的野生型腺病毒感染和/或通过重复注射基于Ad5的疫苗而导致的对腺病毒中和抗体的诱导(每种均导致针对靶TAA的免疫刺激不充足)而存在于潜在疫苗中。

[0012] 因此,仍然需要更多有效的癌症疫苗载体候选物。需要允许进行多次疫苗接种和在具有预先存在的对Ad的免疫力的个体中进行疫苗接种的靶向癌症的Ad疫苗载体。虽然通过递送肿瘤相关抗原(TAA)实现的癌症免疫治疗提供了存活期益处,但存在对这些策略的限制,并且需要更多的免疫有效的疫苗。

发明内容

[0013] 为了克服这些挑战,本发明提供了用于增强对复杂疾病如感染性疾病和癌症的治疗反应的组合多靶向疫苗、免疫治疗和方法。本公开内容涉及用于在个体中产生免疫应答以抵抗感染性疾病和癌症的组合物、方法和试剂盒。本公开内容提供了用于产生针对靶抗原或者表达或呈递靶抗原或包含至少一种靶抗原的靶抗原标记(signature)的细胞的免疫应答的组合物、方法和试剂盒。

[0014] 已经发现,Ad5[E1-,E2b-]载体不仅比Ad5[E1-]载体更安全,而且在诱导抗原特异性免疫应答方面似乎更优越,从而使得它们更适合作为递送可导致临床反应的MUC1、T和/或CEA疫苗的平台。在其他情况下,免疫诱导可能需要数月的时间。Ad5[E1-,E2b-]载体不仅比Ad5[E1-]载体更安全,而且在诱导抗原特异性免疫应答方面似乎更优越,从而使得它们更适合作为递送可导致临床反应的MUC1c、T和/或CEA疫苗的平台。

[0015] 本发明的各个实施方案通过利用新型Ad5[E1-,E2b-]载体系统为开发针对MUC1、T和/或CEA的治疗疫苗提供长期受欢迎的需要的优势,克服了采用其他Ad5系统所发现的障碍,并允许对先前已经暴露于Ad5的人进行免疫。在本发明的其他实施方案中,通过利用新型Ad5[E1-,E2b-]载体系统为开发针对MUC1c、T和/或CEA的治疗疫苗提供长期受欢迎的需

要的优势,克服了采用其他Ad5系统所发现的障碍,并允许对先前已经暴露于Ad5的人进行免疫。在本发明的其他实施方案中,通过利用新型Ad5[E1-,E2b-]载体系统为开发针对MUC1n、T或CEA的治疗疫苗提供长期受欢迎的需要的优势,克服了采用其他Ad5系统所发现的障碍,并允许对先前已经暴露于Ad5的人进行免疫。

[0016] 为了解决自身肿瘤抗原的低免疫原性,提供了多种先进的多组分疫苗接种策略,包括佐剂和免疫刺激细胞因子的共同施用。本发明涉及提供先天性促炎信号并同时被工程化为表达感兴趣的抗原的重组病毒载体。特别感兴趣的是已被反复用于人类中以诱导稳定的T细胞介导的免疫(CMI)应答,并同时均保持广泛的安全性的基于腺病毒血清型-5(Ad5)的免疫治疗剂。

[0017] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含含有编码MUC1-C抗原的序列的重组复制缺陷型病毒载体,其中所述编码MUC1-C抗原的序列与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少80%的序列同一性。

[0018] 在一些实施方案中,所述MUC1-C抗原包含与SEQ ID NO:9具有至少80%的序列同一性的序列。

[0019] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含含有编码Brachyury抗原的序列的重组复制缺陷型病毒载体,其中编码Brachyury抗原的序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少80%的序列同一性。

[0020] 在一些实施方案中,在施用所述病毒载体的人中诱导针对所述抗原或表达所述抗原的细胞的免疫应答。

[0021] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含含有编码选自下组的至少两种抗原的序列的重组复制缺陷型病毒载体:MUC1-C抗原、Brachyury抗原和CEA抗原。在一些实施方案中,在施用所述病毒载体的人中诱导针对所述至少两种抗原或表达所述至少两种抗原的细胞的免疫应答。

[0022] 在一些实施方案中,所述免疫应答包括针对所述抗原的抗体的产生。在一些实施方案中,所述免疫应答包括细胞介导的免疫(CMI)。在一些实施方案中,所述编码MUC1-C抗原的序列与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少80%的序列同一性。在一些实施方案中,所述编码Brachyury抗原的序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少80%的序列同一性。在一些实施方案中,所述编码CEA抗原的序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少80%的序列同一性。在一些实施方案中,所述抗原包含25、15、10、5个或更少的氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述抗原包含1个氨基酸的修饰。在一些实施方案中,所述重组病毒载体选自:逆转录病毒、慢病毒、巨细胞病毒、仙台病毒、HPV病毒和腺病毒。在一些实施方案中,所述重组病毒载体包括复制缺陷型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述重组病毒载体包括复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E1基因区的缺失。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E3基因区的缺失。在一些实施方案中,所述复制缺陷型腺病毒载体包含E4基因区的缺失。在一些实施方案中,所述重组病毒载体实现所述抗原在转染的细胞中的过表达。在一些实施方案中,所述重组病毒在人中诱导对表达所述抗原的细胞的特异性免疫应答,该特异性免疫应答是基线的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。在一些实施方案中,所述人具有大于50、75、100、125、150、160、

175或200的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性抗体应答。

[0023] 在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性IFN- γ 分泌。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性IL-2分泌。在一些实施方案中,通过ELISpot测定来测量针对所述抗原的免疫应答。在一些实施方案中,所述抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自肿瘤细胞系或自体肿瘤的表达同种异体抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含免疫原性组分。在一些实施方案中,所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。在一些实施方案中,所述免疫原性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。在一些实施方案中,所述CEA抗原包含含有在与SEQ ID NO:3中的位置610对应的位置的天冬氨酸的置换的修饰。在一些实施方案中,所述组合物进一步包含含有免疫途径检查点调节剂的分子组合物。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂激活或加强免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂抑制免疫应答抑制剂。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点抑制免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂靶向选自下组的内源性免疫途径检查点蛋白或其片段:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RPI、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3、GAL9、ADORA、CD276、VTCN1、IDO1、KIR3DL1、HAVCR2、VISTA和CD244。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂靶向PD1蛋白。在一些实施方案中,所述分子组合物包含siRNA、反义、小分子、模拟物、重组形式的配体、重组形式的受体、抗体或其组合。

[0024] 在一个方面,提供了一种选择用于施用所述组合物的人的方法,该方法包括:确定所述人的HLA亚型;以及如果所述HLA亚型被确定为HLA亚型的预选亚组中的一种,则向所述人施用所述组合物。在一些实施方案中,所述HLA亚型的预选亚组包含HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24中的一种或多种。

[0025] 在一个方面,提供了一种治疗人的癌症或感染性疾病的方法,该方法包括向所述人施用所述重组病毒载体。

[0026] 在一个方面,提供了一种在人中产生对MUC1-C、Brachyury、CEA或其任意组合的免疫应答的方法,该方法包括向所述人施用所述组合物。在一些实施方案中,重复所述施用步骤至少一次。在一些实施方案中,在之前的施用步骤后约2、3、4、5或6周后重复所述施用步骤。在一些实施方案中,在之前的施用步骤后约2、3、4、5或6个月后重复所述施用步骤。在一些实施方案中,重复所述施用步骤两次。

[0027] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在所述第一阶段期间,以约3周的间隔向人施用第一组合物总共3次,该第一组合物包含编码MUC1-C抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体;以及在所述第二阶段期间,以约3个月的间隔向所述人施用第二组合物总共3次,该第二组合物包含编码抗原的第二复制缺陷

型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达所述MUC1-C抗原的细胞的免疫应答。

[0028] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和第二阶段;在所述第一阶段期间,以约3周的间隔向人施用第一组合物总共3次,该第一组合物包含编码Brachyury抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体;以及在所述第二阶段期间,以约3个月的间隔向所述人施用第二组合物总共3次,该第二组合物包含编码抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达所述Brachyury抗原的细胞的免疫应答。

[0029] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在所述第一阶段期间,以约3周的间隔向人施用第一组合物总共3次,该第一组合物包含编码选自MUC1-C抗原、Brachyury抗原和CEA抗原的至少两种抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体;以及在所述第二阶段期间,以约3个月的间隔向所述人施用第二组合物总共3次,该第二组合物包含编码抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达所述至少两种抗原的细胞的免疫应答。在一些实施方案中,所述第二阶段在所述第一阶段结束后约3个月开始。

[0030] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在所述第一阶段期间,向人施用第一组合物总共n次,该第一组合物包含编码Brachyury抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体;在所述第二阶段期间,向所述人施用第二组合物总共m次,该第二组合物包含编码抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达所述Brachyury抗原的细胞的免疫应答。

[0031] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在所述第一阶段期间,向人施用第一组合物总共n次,该第一组合物包含编码MUC1-C抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体;在所述第二阶段期间,向所述人施用第二组合物总共m次,该第二组合物包含编码抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达所述MUC1-C抗原的细胞的免疫应答。

[0032] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在所述第一阶段期间,向人施用第一组合物总共n次,该第一组合物包含编码选自MUC1-C抗原、Brachyury抗原和CEA抗原的至少两种抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体;在所述第二阶段期间,向所述人施用第二组合物总共m次,该第二组合物包含编码所述至少两种抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达所述至少两种抗原的细胞的免疫应答。在一些实施方案中,n大于1。在一些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,m大于1。在一些实施方案中,m为3。在一些实施方案中,所述第一阶段为至少2、3、4、5、6、7或8周。在一些实施方案中,所述第二阶段为至少2、3、4、5、6、7或8个月。在一些实施方案中,所述第二阶段在第一阶段结束后3-16周开始。在一些实施方案中,在所述第一阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至少18天。在一些实施方案中,在所述第一阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔约21天。在一些实施方案中,在所述第一阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至多24天。在一些实施方案中,在所述第二阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至少10周。在一些实施方案中,在所述第二阶段,所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔约13周。在一些实施方案中,在所述第二阶段,

所述复制缺陷型腺病毒的两次施用相隔至多16周。在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用包含免疫途径检查点调节剂的分子组合物。

[0033] 在一个方面,提供了一种治疗的方法,该方法包括:选择治疗的第一阶段和治疗的第二阶段;在所述第一阶段期间,向人施用第一组合物总共n次,该第一组合物包含编码抗原的第一复制缺陷型腺病毒载体,该第一复制缺陷型腺病毒载体在人中诱导对表达MUC1-C、Brachyury或CEA抗原的细胞的免疫应答;以及在所述第二阶段期间,向所述人施用第二组合物总共m次,该第二组合物包含编码抗原的第二复制缺陷型腺病毒载体,该第二复制缺陷型腺病毒载体能够在人中诱导针对表达MUC1-C、Brachyury或CEA抗原的细胞的免疫应答;其中在所述第一阶段、所述第二阶段或两个阶段期间施用包含免疫途径检查点调节剂的分子组合物。

[0034] 在一个方面,提供了一种治疗有需要的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用:重组复制缺陷型腺病毒载体,其编码(i) MUC1-C抗原,(ii) Brachyury抗原,或(iii) 选自MUC1-C抗原、Brachyury抗原和CEA抗原的至少两种抗原;以及包含免疫途径检查点调节剂的分子组合物;从而在所述受试者中产生免疫应答。在一些实施方案中,(a) 和(b) 连续施用。在一些实施方案中,(a) 和(b) 同时施用。在一些实施方案中,(a) 和(b) 相隔一个月施用。

[0035] 在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂激活或加强免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂抑制免疫应答抑制剂。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点抑制免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂靶向选自下组的内源性免疫途径检查点蛋白或其片段:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RP1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3、GAL9、ADORA、CD276、VTCN1、IDO1、KIR3DL1、HAVCR2、VISTA和CD244。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂靶向PD1蛋白。在一些实施方案中,所述分子组合物包含siRNAs、反义、小分子、模拟物、重组形式的配体、重组形式的受体、抗体或其组合。

[0036] 在一些实施方案中,所述免疫应答增加了至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25倍。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体与所述第二复制缺陷型腺病毒载体是相同的。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体包含复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述人表达血清型HLA-A2、HLA-A3或HLA-A24的人白细胞抗原。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体包含E2b基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E1基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E3基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E4基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E2b基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E1基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E3基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第二复制缺陷型腺病毒载体进一步包含E4基因区的缺失。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含至少 1.0×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个含有重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合

物、所述第二组合物或这两种组合物包含至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 或 $1.0-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一组合物、所述第二组合物或这两种组合物包含 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述第一阶段为至少2、3、4、5、6、7或8周。在一些实施方案中,所述第二阶段为至少2、3、4、5、6、7或8个月。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性抗体应答。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性细胞介导的免疫(CMI)。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性IFN- γ 分泌。在一些实施方案中,所述免疫应答被测量为抗原特异性IL-2分泌。在一些实施方案中,通过ELISpot测定来测量针对所述抗原的免疫应答。在一些实施方案中,所述抗原特异性CMI大于25、50、75、100、150、200、250或300个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,通过CAP-1脉冲抗原呈递细胞、来自肿瘤细胞系或自体肿瘤的表达同种异体抗原的细胞的T细胞裂解来测量所述免疫应答。在一些实施方案中,第一或第二复制缺陷型腺病毒感染所述人中的树突细胞,并且其中感染的树突细胞呈递所述抗原,从而诱导所述免疫应答。在一些实施方案中,所述施用步骤包括皮下(sc)施用。在一些实施方案中,在所述施用步骤之前,所述人携带大于50、75、100、125、150、160、175、200、225、250、275或300的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述人具有大于250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或4767的逆Ad5中和抗体滴度。在一些实施方案中,所述人不同时通过类固醇、皮质类固醇和免疫抑制剂中的任一种进行治疗。在一些实施方案中,所述人没有自身免疫病。在一些实施方案中,所述人没有炎症肠病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性硬化、病毒性肝炎或HIV。

[0037] 在一些实施方案中,所述人患有或将来可能患有感染性疾病。在一些实施方案中,所述人患有自身免疫相关甲状腺疾病或白癜风。在一些实施方案中,所述人患有或将来可能患有增殖性疾病癌症。在一些实施方案中,所述人患有结肠直肠癌腺癌、转移性结肠直肠癌、晚期MUC1-C、表达Brachyury或CEA的结肠直肠癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌或胰腺癌。在一些实施方案中,所述人具有至少1、2或3个转移性疾病部位。在一些实施方案中,所述人包含过表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞。在一些实施方案中,相对于非癌细胞中的基线MUC1-C、Brachyury或CEA表达,所述过表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞将所述MUC1-C、Brachyury或CEA过表达了至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。在一些实施方案中,过表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞包括癌细胞。在一些实施方案中,所述受试者具有诊断的疾病倾向。在一些实施方案中,所述受试者患有稳定的疾病。在一些实施方案中,所述受试者具有疾病的遗传倾向。在一些实施方案中,所述疾病为癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自前列腺癌、结肠癌、乳腺癌或胃癌。

[0038] 在一些实施方案中,所述癌症为前列腺癌。在一些实施方案中,所述受试者具有6

或更少的格里森得分。在一些实施方案中,所述受试者具有大于6的格里森得分。在一些实施方案中,所述第一或第二复制缺陷型腺病毒载体包含与SEQ ID NO:3具有至少80%的序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第一或第二复制缺陷型腺病毒载体包含与SEQ ID NO:3中选自26048-26177、26063-26141、1-103、54-103、32214-32315和32214-32262的区域具有至少80%的序列同一性的区域。在一些实施方案中,所述第一或第二复制缺陷型腺病毒载体包含与SEQ ID NO:3中位置1057至3165的区域具有至少80%的序列同一性的区域。在一些实施方案中,所述第一或第二复制缺陷型腺病毒载体包含编码MUC1-C、Brachyury或CEA抗原的序列;其中所述MUC1-C抗原被与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少80%的序列同一性的序列所编码;其中所述Brachyury抗原被与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少80%的序列同一性的序列所编码;其中所述CEA抗原被与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少80%的序列同一性的序列所编码。

[0039] 在一个方面,提供了一种用于诱导人中的免疫应答的试剂盒,该试剂盒包含:包含在0.8-1.2mL范围内的体积的治疗性溶液的组合物,所述治疗性溶液包含至少 1.0×10^{11} 个病毒颗粒;其中所述病毒颗粒包含重组复制缺陷型腺病毒载体;包含分子组合物的治疗性溶液的组合物,该分子组合物包含免疫途径检查点调节剂;以及说明书。

[0040] 在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $1.0-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,腺病毒载体能够实现修饰的MUC1-C、Brachyury或CEA在感染的细胞中的过表达。在一些实施方案中,治疗性溶液包含第一、第二和第三复制缺陷型腺病毒载体,该第一、第二和第三复制缺陷型腺病毒载体各自包含选自MUC1-C抗原、Brachyury抗原、CEA抗原及其组合的抗原。在一些实施方案中,所述腺病毒载体包含编码抗原的核酸序列,该抗原在人中诱导对表达MUC1-C、Brachyury或CEA的细胞的特异性免疫应答。在一些实施方案中,所述免疫途径检查点调节剂靶向选自下组的内源性免疫途径检查点蛋白或其片段:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RP1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3、GAL9、ADORA、CD276、VTCN1、IDO1、KIR3DL1、HAVCR2、VISTA和CD244。在一些实施方案中,所述分子组合物包含siRNA、反义、小分子、模拟物、重组形式的配体、重组形式的受体、抗体或其组合。在一些实施方案中,所述说明书用于增殖性疾病或癌症的治疗。在一些实施方案中,所述说明书用于感染性疾病的治疗。在一些实施方案中,所述腺病毒载体包括复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含至少 1.0×10^{11} 、 2.0×10^{11} 、 3.0×10^{11} 、 3.5×10^{11} 、 4.0×10^{11} 、 4.5×10^{11} 、 4.8×10^{11} 、 4.9×10^{11} 、 4.95×10^{11} 或 4.99×10^{11} 个含有重组核酸载体的病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含至多 7.0×10^{11} 、 6.5×10^{11} 、 6.0×10^{11} 、 5.5×10^{11} 、 5.2×10^{11} 、 5.1×10^{11} 、 5.05×10^{11} 或 5.01×10^{11} 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $1.0-7.0 \times 10^{11}$ 或 $1.0-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.5-5.5 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.8-5.2 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.9-5.1 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.95-5.05 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述治疗性溶液包含 $4.99-5.01 \times 10^{11}$ 个病毒颗粒。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含免疫原性组分。在一些实施方案中,所述免疫原性组分包括选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的细胞因子。在一些实施方案中,所述免疫原

性组分选自IL-7、编码IL-7的核酸、与IL-7具有基本的同一性的蛋白质以及编码与IL-7具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

[0041] 援引并入

[0042] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用而并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

附图说明

[0043] 图1例示了显示来自用Ad5-空壳(空载体)免疫的小鼠的抗体水平的柱状图。用Ad5-空壳病毒颗粒(VP)以14天的间隔对小鼠进行三次免疫。每次免疫后抗Ad抗体(中和抗体)水平升高。

[0044] 图2例示了显示来自用Ad5-空壳免疫的小鼠的中和抗体(NAb)水平的柱状图。用Ad5-空壳VP以14天的间隔对小鼠进行三次免疫。每次免疫后中和抗体水平升高。光密度读数指示活靶细胞的存在。

[0045] 图3例示了显示用Ad5-空壳载体平台注射后C57B1/6小鼠中的NAb诱导的柱状图。用Ad颗粒重复注射后,在小鼠中诱导了升高水平的NAb。

[0046] 图4A例示了显示从用Ad5[E1-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫的Ad5免疫小鼠脾细胞分泌的INF- γ 水平的柱状图。Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫组中显示出显著升高的应答。

[0047] 图4B例示了显示从用Ad5[E1-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫的Ad5免疫小鼠脾细胞分泌的IL-2的柱状图。Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫组中显示出显著升高的应答。

[0048] 图5例示了显示对照小鼠和采用 1×10^{10} 个Ad5[E1-]-CEA VP或Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP进行疫苗接种的小鼠中血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平的柱状图。

[0049] 图6例示了显示注射有表达MC38 CEA的肿瘤细胞并随后用Ad5[E1-,E2b-]-CEA疫苗治疗(Vac)的Ad5免疫C57B1/6小鼠中随时间推移的肿瘤体积的线型图。显示出到第19-21天肿瘤大小相比于未治疗的携带肿瘤的小鼠显著降低。

[0050] 图7例示了显示来自7只治疗和7只未治疗的Ad5免疫的携带MC38肿瘤的小鼠的肿瘤重量的图。显示出用Ad5[E1-,E2b-]-CEA治疗的小鼠中的肿瘤重量的显著($p=0.0124$)降低。

[0051] 图8为使用抗Gag小鼠单克隆抗体的免疫印迹,并且例示了感染有Ad5[E1-,E2b-]-Gag的A549细胞的Gag产生。将A549全细胞裂解物用Ad5[E1-,E2b-]-gag或Ad5-空壳以200的感染复数(MOI)感染44小时。上方的条带(55kDa)包含gag前体。下方的条带(41kDa)包含p17/p24 gag复合体。

[0052] 图9为例示多次免疫对诱导更强的细胞介导的免疫(CMI)应答的影响的图。用 1×10^{10} 个Ad5[E1-]-空壳VP、Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP、Ad5[E1-]-Gag VP、Ad5[E1-,E2b-]-Gag VP或单独的缓冲液以14天的间隔对Ad5-未处理(**Naïve**)BALB/C小鼠($n=5$ /组)进行一次或三次免疫。在最终的免疫后14天,通过ELISpot分析来评估来自脾细胞的INF- γ 分泌。阳性对照脾细胞暴露于伴刀豆球蛋白A(Con A)。

[0053] 图10A例示了来自针对野生型Ad5预先免疫的食蟹猴($n=3$)的外周血单核细胞(PBMC)的ELISpot INF- γ 分析结果。显示出升高水平的INF- γ 诱导($P<0.05$)。阳性对照脾细胞暴露于Con A。

[0054] 图10B例示了来自图10A的ELISpot IL-2分析的结果。

[0055] 图11例示了描绘来自采用分泌IFN- γ 的重组Ad5 CEA表达载体进行疫苗接种的小鼠的斑点形成细胞(SFC)的数目的图。显示出采用Ad5[E1-]-CEA进行疫苗接种的小鼠的SFC的降低与采用Ad5[E1-,E2b-]-CEA进行疫苗接种的小鼠的SFC的降低的对比。

[0056] 图12A例示了用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗的队列1和队列2中7名患者的Kaplan-Meier生存图。

[0057] 图12B例示了用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗的队列3和Ph II中21名患者的Kaplan-Meier生存图。

[0058] 图12C例示了用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗的队列5中6名患者的Kaplan-Meier生存图。

[0059] 图12D例示了用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗的所有34名患者的Kaplan-Meier生存图。

[0060] 图13A例示了用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗三次的28名癌症患者的Kaplan-Meier生存图。

[0061] 图13B例示了用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗的27名结肠直肠癌患者的Kaplan-Meier生存图。

[0062] 图14例示了治疗患者中的CEA导向的CMI应答。在基线时(前)和在Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 施用之后(后)对CMI (IFN- γ 分泌) 进行评估。在治疗后的患者中观察到的最高CMI应答(不论时间点如何)显示出剂量反应。最高的CMI水平发生在接受 5×10^{11} 个VP的最高剂量的患者(队列5)中。与CMI应答的基线(前)值相比,队列3/II期($p=0.0002$;Mann-Whitney检验)和队列5($p=0.0317$;Mann-Whitney检验)的CMI应答显著升高。通过与不相关抗原 β -半乳糖苷酶和HIV-gag的反应性的缺乏显示出应答的特异性。阳性对照PBMC暴露于Con A。

[0063] 图15例示了治疗患者中的CEA导向的CMI应答。在基线时(第0周)和最后一次免疫治疗后3周(第9周)对所有4次剂量队列中的患者的CMI (IFN- γ 分泌) 进行评估。显示出剂量反应,并且最高的CMI水平发生在接受最高剂量的患者中。采用最高剂量的CMI应答显著升高($P<0.02$;Mann-Whitney检验)。通过与不相关抗原 β -半乳糖苷酶和HIV-gag的反应性的缺乏显示出应答的特异性。阳性对照PBMC暴露于Con A。

[0064] 图16A例示了接受采用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 疫苗的免疫的患者中的Ad5免疫应答。在基线时(第0周)和第三次免疫后3周(第9周)测定患者中针对Ad5的Ad5 NAb滴度。通过ELISpot来测定来自对Ad5具有特异性的患者的分泌IFN- γ 的PBMC的数目。Ad5 NAb滴度在第9周时显著升高($P<0.0001$;Mann-Whitney检验)。

[0065] 图16B例示了接受采用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 疫苗的免疫的患者中的Ad5免疫应答。在基线时(第0周)和第三次免疫后3周(第9周)测定患者中的CMI应答。通过ELISpot来测定来自对Ad5具有特异性的患者的分泌IFN- γ 的PBMC的数目。Ad5 CMI应答在第9周时显著升高($P<0.01$;Mann-Whitney检验)。

[0066] 图17A例示了接受采用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 疫苗的免疫的患者中的CEA特异性免疫力以及与Ad5免疫力的比较。示出了相比于在用Ad5[E1-,E2b-]-CEA (6D) 治疗开始前具有高预先存在的Ad5免疫力($\text{NAb} \geq 200$)的患者中的CEA特异性免疫应答,如通过具有无至低预先存在的Ad5免疫力($\text{NAb} < 200$)的患者中PBMC的IFN- γ 分泌所测量的,接受 1×10^{11} VP的

Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)的患者(n=19)中的平均CEA特异性免疫应答。在检测的任何时间点,两组之间均没有显著差异($p>0.4$,Mann-Whitney检验)。

[0067] 图17B例示了预先存在的Ad5 NAb活性与诱导的CEA CMI应答的最高水平之间相关性的图。 r^2 值(0.0155)指示预先存在的Ad5 NAb活性与CEA CMI ELISpot反应之间没有相关性。

[0068] 图17C例示了载体诱导的Ad5 NAb活性与CEA CMI应答之间相关性的图。 r^2 值(0.0069)指示载体诱导的Ad5 NAb活性与CEA CMI ELISpot反应之间没有相关性。

[0069] 图18例示了示出Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)免疫治疗在用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)治疗的32名转移性结肠直肠癌(mCRC)患者中的效果的Kaplan-Meier生存图。

[0070] 图19例示了mCRC患者在基线时(免疫前)和在Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)施用后(免疫后)的CMI应答($\text{IFN-}\gamma$ 分泌)。在治疗后的患者中观察到的最高CMI应答(不论时间点如何)显示出剂量反应。最高的CMI水平发生在接受最高剂量的患者(队列5)中,并且显著升高($p<0.02$;Mann-Whitney检验)。通过与不相关抗原 β -半乳糖苷酶和HIV-gag的反应性的缺乏显示出应答的特异性。对于阳性对照,PBMC暴露于Con A。

[0071] 图20例示了在第0、3、6和9周评估的免疫的mCRC患者中的CMI应答(ELISpot $\text{IFN-}\gamma$ SFC)。免疫期间CMI应答增加。

[0072] 图21例示了免疫治疗前(第0周)和免疫治疗后(第6-9周)评估的细胞毒性T细胞(CTL)介导的细胞毒性反应(ELISpot分泌粒酶B的SFC)。免疫后应答增加($P<0.05$,Wilcoxon检验)。

[0073] 图22例示了如通过ELISpot $\text{IFN-}\gamma$ SFC所评估的、来自5名免疫的mCRC患者的随访PBMC样品中的CMI应答。CMI应答在第9周时达到峰值,并到治疗停止后第26周降低。

[0074] 图23例示了如通过针对来自脾细胞的 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌的ELISpot测定($\text{IFN-}\gamma$ SFC)所评估的,针对CEA、MUC1和Brachyury进行免疫的小鼠中的CMI应答。在多靶向免疫小鼠(CEA(6D)、mMUC1-C和Brachyury)中检测到 $\text{IFN-}\gamma$ SFC,但在注射有Ad5-空壳(空载体)的对照小鼠中未检测到 $\text{IFN-}\gamma$ SFC。通过与不相关SIV-nef或SIV-vif肽抗原的反应性的缺乏来确认ELISpot测定的反应特异性。阳性对照包括暴露于Con A的细胞。

[0075] 图24A例示了用CEA(6D)、mMUC1-C和Brachyury免疫的小鼠中表达 $\text{IFN-}\gamma$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的多功能 $\text{CD8}\alpha^+$ 脾细胞的流式细胞术结果的柱状图,但未示出注射有Ad5-空壳的对照的结果。通过与单独培养基或者不相关SIV-nef或SIV-vif肽的反应性的缺乏来确认反应的特异性。

[0076] 图24B例示了用CEA(6D)、mMUC1-C和Brachyury免疫的小鼠中表达 $\text{IFN-}\gamma$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的多功能 CD4^+ 脾细胞的流式细胞术结果的柱状图,但未示出注射有Ad5-空壳的对照的结果。通过与单独培养基或者不相关SIV-nef或SIV-vif肽的反应性的缺乏来确认反应的特异性。

[0077] 图25A例示了显示在用CEA(6D)、mMUC1-C和Brachyury免疫的小鼠中诱导的CEA抗体依赖性细胞毒性(ADCC)反应的统计学显著性($p<0.0001$)的柱状图,但未示出在对照小鼠中的结果。

[0078] 图25B例示了显示在用CEA(6D)、mMUC1-C和Brachyury免疫的小鼠中诱导的CEA补体依赖性细胞毒性(CDCC)反应的统计学显著性($p<0.0001$)的柱状图,但未示出在对照小鼠

中的结果。

[0079] 图26A例示了在第0、7、14天在左侧用表达MUC1肿瘤细胞的MC38肿瘤细胞进行皮下接种,并在右侧施用 1×10^{10} 个Ad5-空壳VP或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C VP的C57B1/6小鼠($n=7$ /组)的结果。用Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C治疗的小鼠在第15天和第18天相比于对照具有显著($p<0.05$)更小的肿瘤和显著更长的存活期。实验在第36天终止。

[0080] 图26B例示了如针对图26A所述用Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C治疗的小鼠在第15天和第18天相比于对照具有显著($p<0.05$)更长的存活期。

[0081] 图27例示了在第5、11和17天在左侧用表达Brachyury的MC38肿瘤细胞进行皮下接种,并在右侧施用 1×10^{10} 个Ad5-空壳VP($n=4$)或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP($n=5$)的C57B1/6小鼠的结果。在第15、19和22天,治疗的小鼠中的肿瘤更小。

[0082] 图28例示了HPV免疫治疗在植入表达HPV-E6/E7的TC-1肿瘤细胞(第0天),并通过在第10、17、24天用 1×10^{10} 个Ad5-空壳VP加100 μ g对照IgG(腹膜内), 1×10^{10} 个Ad5-空壳VP加100 μ g抗PD1, 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7 VP加100 μ g小鼠IgG,或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7 VP加100 μ g抗PD1进行免疫治疗的C57B1/6小鼠($n=7$ /组)中的效果。使用或不使用抗PD1的免疫治疗到第23天导致肿瘤生长的显著抑制($p<0.05$)。所有对照小鼠均由于肿瘤质量而到第23天被终止。

[0083] 图29例示了组合多靶向HPV免疫治疗对图28中通过用抗PD1注射进行免疫治疗而治疗的2只小鼠中的肿瘤生长和消退的影响。肿瘤生长分别在第20天和第27天达到峰值,并在此后消退。

[0084] 图30A例示了感染有Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury的人树突细胞(DC)中Brachyury蛋白的表达。SW620肿瘤细胞用作阳性对照。肌动蛋白用作加载对照。Brachyury的表达在感染有Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury的DC中是稳定的。

[0085] 图30B例示了感染有Ad5[E1-,E2b-]-MUC1的人DC中MUC1蛋白的表达。SW620肿瘤细胞用作阳性对照。肌动蛋白用作加载对照。与感染有Ad5[E1-,E2b-]-空壳的DC相比,在感染有Ad5[E1-,E2b-]-MUC1载体的人DC中观察到MUC1表达。

[0086] 图31A例示了从来自用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP或Tri-Ad5(1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP和 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP的1:1:1混合物)以2周的间隔进行三次疫苗接种的C57B1/6小鼠($n=5$ /组)的脾细胞分泌的IFN- γ 的分析。对照接受 3×10^{10} 个Ad5-空壳VP。在最终疫苗接种后14天收集脾细胞,并通过ELISpot测定评估脾细胞的IFN- γ 分泌。阳性对照脾细胞暴露于Con A。以p值报告柱之间的显著性差异($p<0.05$)。不显著=ns。

[0087] 图31B例示了从来自图31A中所述的进行疫苗接种的小鼠的脾细胞分泌的IL-2的分析。通过ELISpot测定评估脾细胞的IL-2分泌。

[0088] 图32A例示了用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP或Tri-Ad5(1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP和 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP的1:1:1混合物)以2周的间隔进行三次疫苗接种的C57B1/6小鼠($n=5$ /组)疫苗接种后的CD8⁺和多功能细胞群体的分析图。对照接受 3×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP。在最终疫苗接种后14天收集脾细

胞,并通过FACS评估脾细胞的分泌IFN- γ 和TNF- α 的CD8 α^+ 细胞。阳性对照脾细胞暴露于Con A。

[0089] 图32B例示了来自图32A中所述的疫苗接种小鼠的CD4 $^+$ 细胞和多功能细胞群体的FACS分析图。

[0090] 图32C例示了来自图32A中所述的疫苗接种小鼠的分泌IFN- γ 和TNF- α 的CD8 α^+ 细胞的FACS分析图。

[0091] 图32D例示了来自图32A中所述的疫苗接种小鼠的分泌IFN- γ 和TNF- α 的CD4 $^+$ 细胞的FACS分析图。

[0092] 图33A例示了用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP、Tri-Ad5(1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP和 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP的1:1:1混合物)进行三次疫苗接种的小鼠中的CEA IgG水平的ELISA分析。

[0093] 图33B例示了使用图33A中所述小鼠进行的针对MC38-CEA2细胞的CDC测定。

[0094] 图34例示了免疫治疗对用 1×10^6 个MC-38-MUC1细胞和 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP或Tri-Ad5(1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-CEA VP、 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-MUC1 VP和 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury VP的1:1:1混合物(总计 3×10^{10} 个VP))在左侧进行皮下接种的C57BL/6小鼠($n=7$ /组)中的肿瘤体积的影响。对照小鼠接受 3×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP。(*)表示当Ad5[E1-,E2b-]-MUC1治疗小鼠比对照小鼠具有显著更小($p<0.05$)的肿瘤时的天数,并且(^)表示当Tri-Ad5治疗小鼠比对照小鼠具有显著更小($p<0.05$)的肿瘤时的天数。在Ad5[E1-,E2b-]-MUC1与Tri-Ad5治疗小鼠之间没有观察到显著性差异($p>0.1$)。

[0095] 图35例示了显示感染有Ad5[E1-,E2b-]-CEA的A549细胞中的CEA表达的免疫印迹。(A) 阴性对照。(B) 蛋白质分子量标志物。(C) 阴性。(D) CEA参照物质(30ng)。(E) Ad5[E1-,E2b-]-CEA裂解物(20 μ L)。(F) Ad5[E1-,E2b-]-CEA裂解物(20 μ L)。(G) 阴性A549细胞。将重组CEA用作阳性对照,并将未感染的A549细胞作为阴性对照。

[0096] 图36例示了如通过来自用 1×10^8 、 1×10^9 或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP的剂量以14天的间隔免疫三次的C57BL/6小鼠($n=5$ /组)的脾细胞的ELISpot所测量的、并在最终免疫后14天评估的CMI剂量反应。用 1×10^{10} 个VP的剂量实现了CMI的最大诱导。阳性对照脾细胞暴露于Con A。

[0097] 图37A例示了在用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP以两周的间隔免疫三次的C57BL/6小鼠($n=5$ /组)免疫后的CD8- α^+ /IFN- γ^+ 脾细胞的活化。对照接受 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP。通过流式细胞术来评估最终免疫后14天收集的脾细胞。对于阳性对照,脾细胞暴露于PMA/离子霉素。

[0098] 图37B例示了如图37A所述的小鼠免疫后的CD8- α^+ /IFN- γ^+ /TNF- α^+ 脾细胞的活化。

[0099] 图38A例示了在第0天植入 2×10^5 个不可察觉的HPV-E6/E7 TC-1肿瘤细胞,并在第1、8和15天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP的免疫治疗C57BL/6小鼠($n=5$ /组)的肿瘤大小的变化。确定肿瘤大小,并根据公式 $V=(a^2 \times b)/2$ 计算体积。使用非配对t检验在实验组与载体对照组之间进行显著性分析,并用*($p<0.05$)和**($p<0.01$)表示显著性。

[0100] 图38B例示了使用Mantel-Cox检验进行绘制和比较的如图38A中所述的小鼠的生

存曲线。用** ($p < 0.01$) 表示显著性。

[0101] 图39A例示了在第0天植入 2×10^5 个小的可察觉的HPV-E6/E7TC-1肿瘤细胞,并在第6、13和20天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP的免疫治疗C57BL/6小鼠 ($n=4$ /组)的肿瘤大小的变化。确定肿瘤大小,并根据公式 $V = (a^2 \times b) / 2$ 计算体积。使用非配对t检验在实验组与载体对照组之间进行显著性分析,并用** ($p < 0.01$) 表示显著性。

[0102] 图39B例示了使用Mantel-Cox检验进行绘制和比较的如图39A中所述的小鼠的生存曲线。用** ($p < 0.01$) 表示显著性。

[0103] 图40A例示了在第0天植入 2×10^5 个大的已建立的HPV-E6/E7TC-1肿瘤细胞,并在第13、20和27天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP或 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP的免疫治疗C57BL/6小鼠 ($n=4$ /组)的肿瘤大小的变化。确定肿瘤大小,并根据公式 $V = (a^2 \times b) / 2$ 计算体积。使用非配对t检验在实验组与载体对照组之间进行显著性分析,并用** ($p < 0.01$) 表示显著性。

[0104] 图40B例示了使用Mantel-Cox检验进行绘制和比较的如图40A中所述的小鼠的生存曲线。用** ($p < 0.01$) 表示显著性。

[0105] 图41A例示了在第0天接种 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞,并在第10、17和24天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP加100 μ g同种型对照大鼠IgG进行治疗的C57BL/6小鼠 ($n=7$ /组)的肿瘤大小的变化。确定肿瘤大小,并根据公式 $V = (a^2 \times b) / 2$ 计算体积。肿瘤生长动力学代表各组中的单个小鼠。

[0106] 图41B例示了在第0天接种 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞,并在第10、17和24天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-空壳VP加100 μ g抗PD1抗体进行治疗的C57BL/6小鼠 ($n=7$ /组)的肿瘤大小的变化。

[0107] 图41C例示了在第0天接种 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞,并在第10、17和24天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP加100 μ g同种型对照大鼠IgG进行治疗的C57BL/6小鼠 ($n=7$ /组)的肿瘤大小的变化。

[0108] 图41D例示了在第0天接种 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞,并在第10、17和24天施用 1×10^{10} 个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7 VP加100 μ g抗PD1进行治疗的C57BL/6小鼠 ($n=7$ /组)的肿瘤大小的变化。

[0109] 图42例示了如图41A-D中那样治疗的C57BL/6小鼠 ($n=7$ /组)的生存曲线。实验在肿瘤植入后第52天终止。与两组对照小鼠 (Ad5[E1-,E2b-]-空壳和对照抗体或者Ad5[E1-,E2b-]-空壳和抗PD1抗体) 相比,用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7和对照抗体治疗的小鼠显示出显著 ($p < 0.008$) 更长的存活期。2/7 (29%) 的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7和对照抗体治疗的小鼠在第52天仍然存活。与两组对照相比,用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加抗PD1抗体治疗的小鼠显示出显著 ($p < 0.0006$) 更长的存活期。4/7 (57%) 的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加抗PD1抗体治疗的小鼠在第52天仍然存活。

[0110] 图43A例示了Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7促进CD8+肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 向TC-1肿瘤中的募集。向C57BL/6小鼠 ($n=5$ /组) 植入 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞。植入后12天,开始用Ad5[E1-,E2b-]-空壳空载体加对照IgG、Ad5[E1-,E2b-]-空壳加抗PD1、Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加对照IgG或Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加抗P-1治疗小鼠。每周皮下施用疫苗,并且每3-4天经

由脑内注射施用抗PD1抗体,并在第27天对肿瘤进行分析。Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7治疗显著降低了Treg/CD8⁺TIL的比例。使用非配对t检验进行显著性分析,并用ns (p>0.05)、* (p<0.05)、** (p<0.01)、*** (p<0.001) 或**** (p<0.0001) 表示显著性。

[0111] 图43B例示了图43A的Treg/CD8⁺TIL的比例的降低不是由Treg的数目减少所致。

[0112] 图43C例示了图43A的Treg/CD8⁺TIL的比例的降低是由CD8⁺TIL的数目增加所致。

[0113] 图44A例示了Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7加抗PD1抗体联合治疗促进促炎肿瘤微环境。对C57BL/6小鼠 (n=5/组) 进行肿瘤植入、治疗,并对肿瘤进行分析(如图43A-C所示)。在来自用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7治疗的小鼠的肿瘤中,PD1⁺CD4⁺和CD8⁺TIL的频率增加。来自用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7和抗PD1的联合治疗的小鼠的肿瘤具有显著更低频率的PD1⁺CD4⁺和CD8⁺TIL (A)、LAG-3⁺CD8⁺TIL (B) 以及 (C)。使用非配对t检验进行显著性分析,并用ns (p>0.05)、* (p<0.05)、** (p<0.01) 或*** (p<0.001) 表示显著性。

[0114] 图44B例示了来自如图44A所示用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7和抗PD1的联合治疗的小鼠的肿瘤具有显著更低频率的LAG-3⁺CD8⁺TIL,从而使得这些水平更符合来自对照小鼠的肿瘤。

[0115] 图44C例示了来自如图44A所示用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7和抗PD1的联合治疗的小鼠的肿瘤具有显著降低的PDL1表达水平。

具体实施方式

[0116] 以下段落更详细地描述了本发明的不同方面。除非有明确相反的指示,否则本发明的各个方面可与本发明的任何其他一个或多个方面相组合。特别地,任何被指示为优选或有利的特征可与被指示为优选或有利的特征中的任何其他特征相组合。

[0117] 除非另有说明,任何实施方案可与任何其他实施方案相组合。本发明的各个方面可以以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本发明范围的硬性限制。因此,范围的描述应被视为具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值,如同明确写出的那样。例如,范围的描述如1至6应被视为具体公开了子范围,如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数值,例如,1、2、3、4、5和6。不论范围的宽度如何这均适用。当范围存在时,该范围包括范围端点。

[0118] 与第一代腺病毒载体相比,本发明的第二代E2b缺失型腺病毒载体的某些实施方案含有DNA聚合酶基因 (pol) 的额外缺失和前末端蛋白 (pTP) 的缺失。与第一代腺病毒载体的5至6kb容量相比,E2b缺失型载体具有高达13kb的基因承载容量,从而容易为编码多种靶抗原中的任一种的核酸序列提供空间。与第一代腺病毒载体相比,E2b缺失型腺病毒载体还具有降低的不良反应。

[0119] 对野生型Ad的先天性免疫应答可能是复杂的,并且似乎从腺病毒载体表达的Ad蛋白发挥着重要作用。具体而言,E2b缺失型载体中前末端蛋白和DNA聚合酶的缺失似乎在注射后第一个24至72h期间减少了炎症,而第一代腺病毒载体在该时间段则刺激炎症。此外,据报道,通过E2b缺失产生的额外的复制嵌段还导致Ad晚期基因的表达降低10,000倍,远远超过E1、E3单独缺失所导致的表达降低。由E2b缺失型腺病毒载体产生的Ad蛋白的降低的水平有效地降低了对Ad抗原的竞争性、不期望的免疫应答的潜力,这些应答阻止在Ad免疫或暴露的个体中重复使用该平台。由第二代E2b缺失型载体诱导的炎症应答的降低导致载体

在抗原呈递细胞(即,树突细胞)感染期间表达所需疫苗抗原的潜力增加,降低了抗原竞争的潜力,从而导致相对于用第一代腺病毒载体所进行的同样尝试,该疫苗对所需抗原更强的免疫作用。E2b缺失型腺病毒载体提供了改善的基于Ad的疫苗候选物,该候选物比先前描述的使用第一代腺病毒载体的疫苗候选物更安全、更有效并且更通用。因此,第一代基于E1缺失型腺病毒亚型5(Ad5)的载体虽然有希望用作癌症疫苗的平台,但在活性方面受到天然存在或诱导的Ad特异性中和抗体的阻碍。不受理论的约束,具有E1和E2b区缺失的基于Ad5的载体(Ad5[E1⁻,E2b⁻])(后者编码DNA聚合酶和前末端蛋白),例如凭借降低的晚期病毒蛋白表达,可避免免疫学清除并诱导对Ad免疫宿主中编码的肿瘤抗原转基因的更有效的免疫应答。

[0120] 本发明涉及用于产生针对靶抗原,特别是与感染性疾病或增殖性细胞疾病如癌症相关或有关的靶抗原的免疫应答的方法和组合物(例如,病毒载体)。本发明涉及用于在个体中产生针对靶抗原,特别是与细胞增殖疾病如癌症有关的靶抗原的免疫应答的方法和组合物。在本发明的各个方面,本文所述的组合物和方法涉及在个体中产生针对表达和/或呈递靶抗原或包含至少一种靶抗原的靶抗原标记的细胞的免疫应答。本发明提供了使用病毒基因递送平台以便对与PD1检查点阻断相组合的HPV基因E6和E7免疫的针对人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)的免疫治疗的组合物和方法。这些组合物和方法利用与免疫途径检查点调节剂组合的Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7疫苗。

[0121] 该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的靶抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对癌胚抗原(CEA),如由细胞表达或呈递的CEA的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达或呈递的CEA(6D)的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的粘蛋白1(MUC1)的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的MUC1c的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的Brachyury(T蛋白(T))的免疫应答。

[0122] 该组合物和方法可用于产生针对由细胞表达和/或呈递的多种靶抗原的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对MUC1c、T或其任意组合的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对T和CEA的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对MUC1c和CEA的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对MUC1和T的免疫应答。例如,该组合物和方法可用于产生针对MUC1c、T和CEA的免疫应答。

[0123] CEA、MUC1c或T的修饰形式可用于旨在引起针对CEA、MUC1c或T或表达和/或呈递CEA、MUC1c或T的细胞的免疫应答的疫苗中。特别地,本发明提供了改善的基于Ad的疫苗,使得可实现针对一个或多个抗原靶实体的多次疫苗接种。在一些实施方案中,所改善的基于Ad的疫苗包含携带靶抗原、片段、其变体或变体片段,如Ad5[E1⁻,E2b⁻]-CEA(6D)的复制缺陷型腺病毒。可基于多种因素,包括免疫原性潜力来选择靶抗原如CEA、MUC1c或T的变体或片段。可利用突变的CEA、CEA(6D)的相对于CEA(WT)的增强的引起免疫应答的能力。重要的是,疫苗接种可在预先存在的对Ad的免疫力存在的情况下进行,或施用于先前采用本发明的Ad载体或其他Ad载体免疫多次的受试者。可向受试者多次施用Ad载体以诱导针对感兴趣的抗原如CEA、MUC1c或T的免疫应答,包括但不限于产生针对一种或多种靶抗原的抗体和CMI应答。

[0124] 以下段落更详细地描述了本发明的不同方面。除非有明确相反的指示,否则本发

明的各个方面可与本发明的任何其他一个或多个方面相组合。特别地,任何被指示为优选或有利的特征可与被指示为优选或有利的特征中的任何其他特征相组合。如本文所用,除非另有说明,否则冠词“一个(a)”意指一个或多个,除非另有明确规定。如本文所用,除非另有说明,否则诸如“含有”、“含”、“包括(include或including)”等术语意指“包含(comprising)”。如本文所用,除非另有说明,否则术语“或”可以是结合性的或分离性的。如本文所用,除非另有说明,否则任何实施方案可与任何其他实施方案相组合。

[0125] “腺病毒”(Ad)是指来自腺病毒科的无包膜DNA病毒。这些病毒可在不限于人类、禽类、牛、猪和犬的物种中找到。本发明考虑使用来自腺病毒科(例如,禽腺病毒属(Aviadenovirus)、哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus)、腺嘌呤-胸腺嘧啶富集性腺病毒属(Atadenovirus)和唾液酸酶同源性腺病毒属(Siadenovirus))的四个属中的任何属的任何Ad作为E2b缺失型病毒载体或含有本文所述其他缺失的载体的基础。此外,在各个物种中均发现了数种血清型。Ad还涉及这些病毒血清型中任一种的遗传衍生物,包括但不限于遗传突变、缺失或转座。

[0126] “辅助腺病毒”或“辅助病毒”是指可提供特定宿主细胞不能提供(该宿主可提供Ad基因产物如E1蛋白)的病毒功能的Ad。该病毒用于以反式提供第二种病毒或辅助依赖性病毒(例如,无内容(gutted)或无内容物(gutless)病毒,或特定区域如E2b或如本文所述的其他区域缺失的病毒)所缺乏的功能(例如,蛋白质);第一个复制缺陷型病毒被认为“帮助”第二个辅助依赖性病毒,从而允许细胞中第二个病毒基因组的产生。

[0127] “5型腺病毒空壳(adenovirus 5null)(Ad5-空壳(Ad5-null))”是指不包含用于表达的任何异源核酸序列的非复制型Ad。

[0128] “第一代腺病毒”是指具有早期区域1(E1)缺失的Ad。在另外的情况下,早期区域3(E3)也可能缺失。

[0129] “无内容(Gutted)”或“无内容物(gutless)”是指所有的病毒编码区均缺失的Ad载体。

[0130] “转染”是指将外来核酸引入真核细胞中。示例性的转染方法包括磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、脂转染、原生质体融合、逆转录病毒感染和生物射弹术(biolistics)。

[0131] “稳定的转染”或“稳定转染的”是指将外来核酸、DNA或RNA引入并整合到被转染细胞的基因组中。术语“稳定的转染子”是指已将外来DNA稳定地整合到基因组DNA中的细胞。

[0132] “报告基因”表示编码报告分子(例如,酶)的核苷酸序列。“报告分子”可在多种检测系统中的任一种中检测,该检测系统包括但不限于基于酶的检测分析(例如,ELISA、组织化学测定)、荧光、放射性和发光系统。可采用大肠杆菌(E.coli) β -半乳糖苷酶基因、绿色荧光蛋白(GFP)基因、人胎盘碱性磷酸酶基因、氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因以及其他报告基因。

[0133] “异源序列”是指与核酸序列连接或被操作以变成与该核酸序列连接的核苷酸序列,该核苷酸序列本质上不与该核酸序列连接或本质上在不同位置处与该核酸序列连接。异源核酸可包括天然存在的核苷酸序列或相对于天然存在的序列的一些修饰。

[0134] “转基因”是指被引入到受试者的细胞或基因组中的任何基因编码区(天然或异源的核酸序列或者融合的同源或异源核酸序列)。转基因可被携带在用于将转基因引入受试

者的细胞中的任何病毒载体上。

[0135] “第二代腺病毒”是指具有E1、E2、E3的全部或部分的Ad,并且在某些实施方案中,从该病毒中删除(去除)E4 DNA基因序列。

[0136] “受试者”是指任何动物,包括但不限于人类、非人灵长类动物(例如,恒河猴或其他类型的猕猴)、小鼠、猪、马、驴、牛、绵羊、大鼠和家禽。

[0137] “免疫原性片段”是指被B细胞和/或T细胞表面抗原受体特异性识别(即特异性结合)从而导致产生特异性针对片段的免疫应答的多肽的片段。

[0138] “靶抗原”或“靶蛋白”是指引起免疫应答的分子,如蛋白质。

[0139] “E2b缺失”是指发生突变以阻止至少一种E2b基因产物的表达和/或功能的DNA序列。因此,在某些实施方案中,“E2b缺失”用于涉及从Ad基因组删除(去除)的特定DNA序列。E2b缺失或“含有在E2b区内的缺失”是指在Ad基因组的E2b区内的至少一个碱基对的缺失。因此,在某些实施方案中,多于一个碱基对缺失,而在另外的实施方案中,至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对缺失。在另一个实施方案中,缺失是Ad基因组的E2b区内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。E2b缺失可以是阻止至少一种E2b基因产物的表达和/或功能的缺失,因此包括E2b特异性蛋白质的编码部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。在某些实施方案中,E2b缺失是阻止E2b区的DNA聚合酶和前末端蛋白中的一种或两种的表达和/或功能的缺失。在另外的实施方案中,“E2b缺失”是指Ad基因组的该区域的DNA序列中的一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。

[0140] “E1缺失”是指发生突变以阻止至少一种E1基因产物的表达和/或功能的DNA序列。因此,在某些实施方案中,“E1缺失”用于涉及从Ad基因组删除(去除)的特定DNA序列。E1缺失或“含有在E1区内的缺失”是指在Ad基因组的E1区内的至少一个碱基对的缺失。因此,在某些实施方案中,多于一个碱基对缺失,而在另外的实施方案中,至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对缺失。在另一个实施方案中,缺失是Ad基因组的E1区内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。E1缺失可以是阻止至少一种E1基因产物的表达和/或功能的缺失,因此包括E1特异性蛋白质的编码部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。在某些实施方案中,E1缺失是阻止E1区域的反式作用转录调控因子中的一种或两种的表达和/或功能的缺失。在另外的实施方案中,“E1缺失”是指Ad基因组的该区域的DNA序列中的一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。

[0141] “产生免疫应答”或“诱导免疫应答”是指在一种或多种免疫细胞(T细胞、B细胞、抗原呈递细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞等)的数目方面或在这些免疫细胞中的一种或多种的活性(CTL活性、HTL活性、细胞因子分泌、细胞因子分泌谱的变化等)方面的统计学上显著的变化,例如,增加或减少。

[0142] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中基本上可互换使用。本发明的多核苷酸可以是单链(编码链或反义链)或双链的,并且可以是DNA(例如,基因组DNA、cDNA或合成的DNA)或RNA分子。RNA分子可包括含有内含子并且以一对一的方式对应于DNA分子的HnRNA分子,以

及不含内含子的mRNA分子。另外的编码或非编码序列可以但并不是必须存在于本发明的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但并不是必须与其他分子和/或支持材料连接。如本文所用的分离的多核苷酸意指基本上远离其他编码序列的多核苷酸。例如,如本文所用的分离的DNA分子不含不相关的编码DNA的大部分,如大染色体片段或其他功能基因或多肽编码区。这是指如原始分离的DNA分子,并且不排除在实验室中后续重组添加到区段的基因或编码区。

[0143] 如本领域技术人员将会理解的,本发明的多核苷酸可包括基因组序列、外基因组序列和质粒编码的序列以及表达或可适于表达如本文所述的靶抗原、抗原片段、肽等的较小的工程化基因区段。这样的区段可自然地进行分离或人为地进行合成修饰。

[0144] 通常,多核苷酸变体将包含一个或多个置换、添加、缺失和/或插入,优选使得由变体多核苷酸编码的多肽的表位的免疫原性或使得异源靶蛋白的免疫原性相对于由天然多核苷酸序列编码的多肽基本不降低。在一些情况下,一个或多个置换、添加、缺失和/或插入可导致由变体多核苷酸编码的多肽的表位的免疫原性增加。如本文其他地方所述,多核苷酸变体可编码靶抗原的变体或其片段(例如,表位),其中变体多肽或其片段(例如,表位)与抗原特异性抗血清和/或T细胞系或克隆反应的倾向相对于天然多肽基本不降低。多核苷酸变体可编码靶抗原的变体或其片段,其中变体多肽或其片段与抗原特异性抗血清和/或T细胞系或克隆反应的倾向相对于天然多肽大幅增加。

[0145] 术语“变体”还应理解为包括异种起源的同源基因。在具体的实施方案中,对靶抗原的变体或片段进行修饰使得它们具有一种或多种降低的生物活性。例如,可对致癌蛋白靶抗原进行修饰以降低或消除该蛋白质的致癌活性,或者可对病毒蛋白质进行修饰以降低或消除一种或多种活性或病毒蛋白质。修饰的CEA蛋白的实例是具有N610D突变从而产生具有增加的免疫原性的变体蛋白的CEA。

[0146] 当比较多核苷酸序列时,如果两个序列中的核苷酸序列在进行如下所述的最大对应关系比对时是相同的,则这两个序列是“相同的”。通常通过比较对比窗口上的序列以鉴定并比较具有序列相似性的局部区域来进行两个序列之间的比较。如本文所用的“比较窗口”是指至少约20个连续位置,通常为30至约75、40至约50个连续位置的区段,其中可在两个序列经过最佳比对后将一个序列与具有相同数目的连续位置的参考序列进行比较。可使用采用默认参数的生物信息学软件的Lasergene套件中的Megalign程序来进行用于比较的序列的最佳比对。或者,可通过Smith和Waterman, *Add. APL. Math* 2:482 (1981) 的本地同一性算法,通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同一性比对算法,通过Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似性方法检索,通过这些算法(GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA)的计算机化实现,或通过检查来进行用于比较的序列的最佳比对。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST和BLAST 2.0算法。例如,可利用本文所述参数,使用BLAST和BLAST 2.0来确定本发明的多核苷酸的百分比序列同一性。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。在一个说明性实例中,对于核苷酸序列,可使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分,总是<0)来计算累积分数。当出现以下情况时,每个方向上的单词点击(word hits)的延伸停止:累积比对得分从其最大获得值下降了数量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,使得累积得分变为零或以下;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序使用以下默认设置:字

长(W)为11,以及期望值(E)为10,以及BLOSUM62评分矩阵对齐,(B)为50,期望值(E)为10, $M=5$, $N=-4$ 以及两条链的比较。

[0147] 可通过在至少20个位置的比较窗口上比较两个最佳比对序列来确定“序列同一性百分比”,其中与用于两个序列最佳比对的参考序列(其不包括添加或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸序列的部分可包括20%或更少,通常5%至15%或10%至12%的添加或缺失(即空位)。通过以下方法来计算百分比:确定在两个序列中均出现的相同核酸碱基的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以参考序列中的位置总数目,并将所得结果乘以100以得到序列同一性百分比。

[0148] 本领域普通技术人员将会理解,由于遗传密码的简并性,存在许多编码如本文所述的感兴趣的特定抗原或其片段的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最小的同源性。然而,本发明特别考虑了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。此外,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因在本发明的范围内。等位基因是由于一个或多个突变,如核苷酸的缺失、添加和/或置换而被改变的内源基因。所得到的mRNA和蛋白质可以但不必具有改变的结构或功能。可使用标准技术(如杂交、扩增和/或数据库序列比较)来鉴定等位基因。

[0149] 组合物

[0150] 用于免疫治疗和疫苗的病毒载体

[0151] 重组病毒载体可用于表达蛋白质编码基因或抗原(例如,TAA和/或IDAA)。基于重组病毒载体的疫苗和免疫治疗的优点包括高效率的基因转导、基因向靶细胞的高度特异性递送、强效免疫应答的诱导和增强的细胞免疫。本公开内容提供了包含病毒基因组关键区域的缺失或插入的重组腺病毒载体。由本公开内容提供的病毒载体可包含编码一种或多种感兴趣的靶抗原或其变体、片段或融合物的异源核酸序列,期望针对该靶抗原或其变体、片段或融合物产生免疫应答。

[0152] 可与本公开内容的方法和组合物一起使用的合适的病毒载体包括但不限于逆转录病毒、慢病毒、原病毒(provirus)、牛痘病毒(Vaccinia virus)、腺病毒、腺相关病毒(adeno-associated viruses)、自身互补型腺相关病毒(self-complementary adeno-associated virus)、巨细胞病毒或仙台病毒。在一些实施方案中,病毒载体可以是有复制能力的。在一些实施方案中,病毒载体可以是复制缺陷型的。对于复制缺陷型病毒载体,病毒的基因组可具有额外轮的复制所需的编码区,以及用其他基因替换或缺失的包装。这些病毒能够感染其靶细胞并递送其病毒有效负载,但随后无法继续导致细胞裂解和死亡的典型裂解途径。根据病毒载体,复制缺陷型病毒载体中可允许的DNA或cDNA插入片段的典型最大长度可以为约8-10千碱基(kB)。

[0153] 逆转录病毒已用于表达抗原,如包含逆转录酶的包膜单链RNA病毒。逆转录病毒载体可以是复制缺陷型的。逆转录病毒载体可以是鼠或禽类来源。逆转录病毒载体可来自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)。可使用需要基因组整合以供基因表达的逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可用于提供长期基因表达。例如,逆转录病毒载体可具有大约7-11kb的基因组大小,并且该载体可携带7-8kb长的外来DNA插入片段。逆转录病毒载体可用于显示低免疫原性,并且大多数患者不显示对逆转录病毒载体的预先存在的免疫力。逆转录病毒载体可用于感染分裂细胞。逆转录病毒载体可用于不感染非分裂细胞。

[0154] 慢病毒载体已用于表达抗原。慢病毒构成逆转录病毒的一个亚类。慢病毒载体可用于感染非分裂细胞。慢病毒载体可用于感染分裂细胞。慢病毒载体可用于感染非分裂细胞和分裂细胞两者。慢病毒通常显示出比逆转录病毒更广泛的向性。几种蛋白质如tat和rev调控慢病毒的复制。这些调控蛋白在逆转录病毒中通常不存在。HIV是已被工程化为转基因递送载体的示例性慢病毒。慢病毒载体的优点与逆转录病毒载体的优点类似。虽然慢病毒可潜在地触发肿瘤发生,但因为慢病毒的整合位点远离携带细胞启动子的位点,所以风险低于逆转录病毒载体。例如,可通过删除HIV病毒包膜和载体产生期间不需要的一些调控基因来生成基于HIV的载体。生成了若干嵌合或修饰的包膜载体(而非亲本包膜),因为该亲本包膜决定了细胞和组织的特异性。

[0155] 巨细胞病毒(CMV)载体已用于表达抗原,并且是疱疹病毒(herpesviruses)的成员。可使用物种特异性CMV(例如,人CMV(HCMV),例如5型人疱疹病毒)。HCMV含有由衣壳包围的235-kb双链线性DNA基因组。包膜含有与细胞受体结合的糖蛋白gB和gH。

[0156] 仙台病毒(SeV)载体已用于表达抗原。SeV是副粘病毒科的包膜单链RNA病毒。SeV基因组编码六种蛋白质和两种包膜糖蛋白HN和F蛋白(其介导细胞进入并确定其向性)。缺乏F蛋白的SeV载体可用作复制缺陷型病毒以改善载体的安全性。在包装细胞中产生的SeV载体可用于表达F蛋白。F基因缺失和转基因插入的基因组可转染到包装细胞中。SeV含有RNA依赖性RNA聚合酶,并且病毒基因组定位于细胞质。这确保了快速基因表达在感染后不久发生,并且确保了SeV的遗传毒性优势。SeV载体可用于显示高效的基因转移。SeV载体可用于转导分裂细胞和非分裂细胞两者。SeV载体可用于转导非分裂细胞。SeV载体可用于转导分裂细胞。例如,SeV载体可用于有效转导人气道上皮细胞。可例如通过粘膜(例如,口和鼻)途径施用SeV载体。与肌肉施用相比,鼻内施用可用于潜在地降低预先存在的对SeV的免疫力的影响。与其他病毒载体相比,SeV载体的转基因容量(3.4kb)较低。SeV与人1型副流感病毒(hPIV-1)高度同源;因此,预先存在的对hPIV-1的免疫力可能对SeV的使用不利。

[0157] 人乳头瘤病毒(HPV)载体可用于表达抗原。例如,通过对基因组中的致癌基因进行修饰,如通过HPV病毒基因组的关键区域的缺失或插入,可将重组载体工程化以增加感染的可预测性并减少不期望的副作用。示例性HPV载体是具有腺病毒载体的融合载体。示例性HPV载体是包含修饰的非致癌的且融合的HPV-E6/E7的Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7病毒载体。

[0158] 腺病毒载体

[0159] 通常,腺病毒对临床是有吸引力的,因为它们可以具有广泛的向性,它们可感染各种分裂和非分裂细胞类型,并且它们可全身使用以及通过哺乳动物身体中更具选择性的粘膜表面而使用。此外,它们的相对热稳定性进一步有利于其临床使用。腺病毒是特征为含有线性双链基因组的二十面体、无包膜衣壳的DNA病毒家族。通常,腺病毒被发现为无包膜病毒,其包含大约~30-35千碱基大小的双链DNA基因组。在人类Ad中,没有一种与任何肿瘤性疾病相关,并且仅在免疫活性个体中引起相对轻度的自限性疾病。由病毒表达的第一个基因是E1基因,该基因用于从存在于野生型基因组中的其他Ad5基因启动子启动高水平基因表达。病毒DNA复制和后代病毒体的组装发生在受感染细胞的核内,并且整个生命周期需要约36hr,并具有每个细胞大约 10^4 个病毒体的输出。野生型Ad5基因组为大约36kb,并编码这样的基因,该基因根据其在DNA复制之前还是之后表达而被分为早期和晚期病毒功能。早

期/晚期勾画 (delineation) 几乎是绝对的, 因为已经证明, 先前感染有Ad5的细胞的超感染导致来自超感染病毒的晚期基因表达的缺乏, 直到其复制了其自身基因组为止。不受理论的约束, 这可能是由于Ad5主要晚期启动子 (MLP) 的复制依赖性顺式激活, 从而阻止了晚期基因表达 (主要为Ad5衣壳蛋白), 直到复制的基因组存在才被包封。本发明的组合物和方法利用了先进的一代 (advanced generation) Ad载体/疫苗的开发中的特征。腺病毒的线性基因组通常两侧为用于DNA复制的两个起始区 (ITR), 并且具有用于RNA聚合酶II介导的转录的8个单位。基因组携带五个早期单位E1A、E1B、E2、E3、E4和E5, 两个单位在病毒复制开始后延迟表达 (IX和IVa2), 并且一个晚期单位 (L) 被细分为L1-L5。一些腺病毒可进一步编码被称为病毒相关 (VA) RNA的一种或两种RNA。

[0160] 提供了诱导人类患者中的先天性和适应性免疫应答的腺病毒。通过病毒基因组的关键区域的缺失或插入, 提供重组载体, 该重组载体被工程化以增加其可预测性并减少不期望的副作用。在一些方面, 本发明提供了一种腺病毒载体, 其包含选自下组的基因组缺失或插入: E1A、E1B、E2、E3、E4、E5、IX、IVa2、L1、L2、L3、L4和L5及其任意组合。

[0161] 本公开内容提供了包含改变的衣壳的重组腺病毒载体。通常, 腺病毒的衣壳主要包括二十面体的20个三角形面, 每个二十面体含有六邻体三聚体的12个拷贝。此外, 还有其他几种额外的次要衣壳蛋白IIIa、VI、VIII和IX。

[0162] 本公开内容提供了包含一种或多种改变的纤突蛋白的重组腺病毒载体。通常, 还形成三聚体的纤突蛋白在12个顶点处插入到五聚体五邻体碱基中。纤突可包含细的N末端尾、轴和旋钮域。轴可包含可变数目的 β -链重复。旋钮可包含一个或多个环A、B、C、D、E、F、G、H、I、J。纤突旋钮环可与细胞受体结合。本公开内容提供了将在疫苗系统中使用以用于治疗癌症和感染性疾病的腺病毒载体。

[0163] 可与本公开内容的方法和组合物一起使用的合适的腺病毒包括但不限于如本文提供的物种特异性腺病毒, 包括人亚组A、B1、B2、C、D、E和F, 或它们的关键基因组区域, 这些亚组可进一步分类为免疫学上不同的血清型。此外, 可与本公开内容的方法和组合物一起使用的合适的腺病毒包括但不限于从灵长类动物、牛、家禽、爬行动物或青蛙鉴定的物种特异性腺病毒或其关键基因组区域。

[0164] 一些腺病毒血清型优先靶向不同的器官。血清型如AdHu1、AdHu2和AdHu5 (亚类C) 通常实现上呼吸道的感染, 而亚类A和F则影响胃肠器官。本公开内容提供了将在优先靶向不同器官中使用以用于治疗器官特异性癌症或器官特异性感染性疾病的重组腺病毒载体。在一些应用中, 改变重组腺病毒载体以降低对哺乳动物中特定器官的向性。在一些应用中, 改变重组腺病毒载体以增强对哺乳动物中特定器官的向性。

[0165] 可通过腺病毒附着于宿主细胞受体的能力来确定其向性。在一些情况下, 宿主细胞附着的过程可能包括纤突的远端旋钮域与宿主细胞表面分子的初始结合, 以及随后五邻体碱基内的RGD基序与 αV 整合蛋白的结合。本公开内容提供了具有改变的向性使得腺病毒载体可被基因工程化以感染宿主的特定细胞类型的重组腺病毒载体。本公开内容提供了具有改变的向性以用于治疗细胞特异性癌症或细胞特异性感染性疾病的重组腺病毒载体。本公开内容提供了具有改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体, 该纤突旋钮来自具有亚组A、B、C、D或F或其组合或RGD序列的插入片段的一种或多种腺病毒。在一些应用中, 包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生对一种或多种特定细胞类型具有降低的向性的载体。在一些应

用中,包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生对一种或多种特定细胞类型具有增强的向性的载体。在一些应用中,包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生具有降低的产物特异性B细胞或T细胞应答的载体。在一些应用中,包含改变的纤突旋钮的重组腺病毒载体产生具有增强的产物特异性B细胞或T细胞应答的载体。

[0166] 本公开内容提供了包被有其他分子以避免病毒中和抗体的作用或改善向宿主细胞中的转导的重组腺病毒载体。本公开内容提供了包被有帮助载体向宿主细胞受体附着的衔接分子的重组腺病毒载体。举例来说,腺病毒载体可包被有衔接分子,该衔接分子将柯萨奇Ad受体(CAR)与CD40L连接,导致树突细胞增强的转导,从而增强受试者中的免疫应答。被类似地工程化用于增强向其他靶细胞类型附着的其他腺病毒载体也被本公开内容所包含。

[0167] Ad5载体

[0168] 在人类和动物中的研究已经证明,预先存在的对Ad5的免疫力可以是商业使用的基于Ad的疫苗的抑制因子。人类具有抗Ad5(人类疫苗中最广泛使用的亚型)抗体的优势,其中所研究的三分之二人类具有抗Ad5的淋巴增殖反应。这种预先存在的免疫力可抑制使用典型的Ad5疫苗的免疫或再免疫,并且可阻止在随后使用Ad5载体的疫苗抗第二抗原的免疫。克服预先存在的抗载体免疫力的问题已经成为深入研究的课题。已经对使用替代人类(基于非Ad5的)Ad5亚型或甚至非人类形式的Ad5的研究进行了检查。即使这些方法在初次免疫中获得成功,但随后的疫苗接种可能由于对新型Ad5亚型的免疫应答而存在问题。为了避免Ad5免疫屏障并改善第一代Ad5[E1-]载体的有限功效以诱导最佳免疫应答,本发明的各个实施方案涉及下一代基于Ad5载体的疫苗平台。

[0169] 构建第一代或E1缺失型腺病毒载体Ad5[E1-],使得转基因仅替换基因的E1区。通常,约90%的野生型Ad5基因组保留在载体中。Ad5[E1-]载体在感染不表达Ad5 E1基因的细胞后具有降低的复制能力并且无法产生感染性病毒。重组Ad5[E1-]载体在允许Ad5[E1-]载体复制和包装的人类细胞(例如,293细胞)中繁殖。Ad5[E1-]载体具有许多积极的特性;其中最重要的一个是它们相对易于扩大规模和cGMP产生。目前,远远超过220项人类临床试验利用Ad5[E1-]载体,其中多于两千名受试者通过皮下(sc)、肌肉(im)或静脉内(iv)给予病毒。此外,Ad5载体不整合;它们的基因组保持游离基因型。通常,对于不整合到宿主基因组中的载体,如果真的发生,则插入诱变和/或种系传播的风险是非常低的。常规的Ad5[E1-]载体具有接近7kb的承载容量。

[0170] 具有E1和E2b区缺失的基于Ad5的载体(Ad5[E1-,E2b-])(后者编码DNA聚合酶和前末端蛋白),凭借降低的晚期病毒蛋白表达,提供机会来避免免疫学清除,并诱导针对Ad-免疫宿主中编码的肿瘤抗原转基因的更有效的免疫应答。新的Ad5平台在E2b区有额外的缺失,从而去除DNA聚合酶和前末端蛋白基因。Ad5[E1-,E2b-]平台具有扩展的克隆容量,该克隆容量足以允许包含许多可能的基因。与Ad5[E1-]载体的7kb容量相比,Ad5[E1-,E2b-]载体具有高达约12kb的基因承载容量,从而为多个基因提供空间(如有需要)。在一些实施方案中,将多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11kb的插入片段引入到Ad5载体中,如Ad5[E1-,E2b-]载体中。E2b区的缺失赋予本发明的Ad5载体有利的免疫特性,通常引发对靶转基因抗原的有效免疫应答,同时使对Ad病毒蛋白的免疫应答最小化。

[0171] 在各个实施方案中,本发明的Ad5[E1-,E2b-]载体即使在Ad免疫力存在的情况下也诱导有效的CMI以及抗该载体表达的疫苗抗原的抗体。与Ad5[E1-]载体相比,Ad5[E1-,

E2b-]载体还具有减少的不良反应,特别是肝毒性和组织损伤的出现。这些Ad5载体的一个关键方面是Ad晚期基因的表达大大降低。例如,可在体内检测Ad5[E1-,E2b-]载体的衣壳纤突蛋白的产生,而纤突表达从Ad5[E1-,E2b-]载体疫苗中去除。对野生型Ad的先天性免疫应答是复杂的。从Ad5[E1-,E2b-]载体删除的蛋白质通常起到重要作用。具体而言,与Ad5[E1-]载体相比,具有前末端蛋白或DNA聚合酶缺失的Ad5[E1-,E2b-]载体在注射后的第一个24h至72h期间显示出减少的炎症。在各个实施方案中,Ad5基因表达的缺乏使得感染的细胞对抗Ad活性不可见,并且允许感染的细胞在延长的时间段内表达转基因,从而发展出对靶标的免疫力。

[0172] 本发明的各个实施方案考虑增加Ad5[E1-,E2b-]载体转导树突细胞的能力,从而通过利用对Ad5[E1-,E2b-]载体病毒蛋白降低的炎症应答以及所产生的对预先存在的Ad免疫力的规避来改善疫苗中的抗原特异性免疫应答。

[0173] 复制缺陷型Ad5载体

[0174] 克服抗Ad免疫力的尝试包括使用Ad5病毒衣壳蛋白中的替代性Ad血清型和/或替代物,其中每一种均具有有限的成功和显著改变所得疫苗的生物分布的潜力。因此,通过进一步降低来自E1缺失型Ad5载体的病毒蛋白质,即已知是预先存在的Ad免疫力靶标的蛋白质的表达,来尝试完全新颖的方法。具体而言,已对新型重组Ad5平台在早期1(E1)基因区域中的缺失以及在早期2b(E2b)基因区域中的额外缺失(Ad5[E1-,E2b-])进行了描述。E2b区(编码DNA聚合酶和前末端蛋白)的缺失导致降低的病毒DNA复制和晚期病毒蛋白表达。该载体平台可用于在癌症和感染性疾病的动物模型中诱导CMI应答,并且更重要的是,该重组Ad5基因递送平台克服了Ad5免疫力的屏障,并且可用于预先存在和/或载体诱导的Ad免疫力的环境中,从而能够实现疫苗的多次同源施用。在具体的实施方案中,本发明涉及包含编码免疫原性多肽的序列的血清型5的复制缺陷型腺病毒载体。免疫原性多肽可以是突变体、天然变体或其片段。

[0175] 在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与野生型免疫原性多肽或其片段具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的修饰序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码野生型多肽亚基的修饰序列。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法涉及包含与SEQ.ID.NO:3具有至少60%的序列同一性的腺病毒衍生的载体。

[0176] 在一些实施方案中,任选地涉及复制缺陷型腺病毒的腺病毒衍生的载体包含与SEQ.ID.NO:3具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%的同一性的序列或通过备选密码子替换从SEQ.ID.NO:3生成的序列。在各个实施方案中,本文所述的腺病毒衍生的载体在E2b区中以及任选地在E1区中具有缺失,该缺失赋予在本文所述的免疫治疗中使用载体的多种优势。

[0177] 在构建本发明的复制缺陷型腺病毒载体时,腺病毒基因组内的某些区域发挥基本功能,并且对于维持基本上保守可能是必需的。这些区域在Lauer等人,J.Gen.Virol.,85,2615-25(2004),Leza等人,J.Virol.,p.3003-13(1988),和Miralles等人,J.Bio.Chem.,Vol.264,No.18,p.10763-72(1983)中进一步进行了描述,这些文献通过引用而整体并入本文。包含与SEQ.ID.NO:3的一部分,如包含SEQ.ID.NO:3的至少约100、250、500、1000个或更多个碱基的部分具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%

的同一性值的序列的重组核酸载体在本发明的范围内。

[0178] 本发明考虑E2b缺失型腺病毒载体的使用,如美国专利号6,063,622;6,451,596;6,057,158;6,083,750;和8,298,549中描述的那些腺病毒载体,这些专利通过引用而整体并入本文。在E2b区具有缺失的载体在许多情况下削弱了病毒蛋白表达并且/或者降低了生成有复制能力的Ad (RCA) 的频率。可利用表达E2b缺失的基因产物的细胞系进行这些E2b缺失型腺病毒载体的繁殖。本文提供了这样的包装细胞系;例如,衍生自HEK-2p3细胞系的E.C7 (正式称为C-7)。

[0179] 此外,E2b基因产物、DNA聚合酶和前末端蛋白可在E.C7或相似细胞中与E1基因产物一起进行组成型表达。基因区段从Ad基因组到生产细胞系的转移具有直接的益处:(1) 增加承载容量;和(2) 降低RCA生成潜力,通常需要两个或更多个独立重组事件来生成RCA。本发明中使用的表达E1、Ad DNA聚合酶和/或前末端蛋白的细胞系可在不需要污染性辅助病毒的情况下使承载容量接近13kb的腺病毒载体能够繁殖。此外,当对病毒生命周期至关重要的基因(例如,E2b基因)被删除时,出现Ad复制或表达其他病毒基因蛋白的进一步削弱。这可以减少感染细胞的免疫识别,并延长外来转基因表达的持续时间。

[0180] E1、DNA聚合酶和前末端蛋白缺失的载体通常不能从E1和E2b区表达相应的蛋白质。此外,它们可显示大部分病毒结构蛋白表达的缺乏。例如,Ad的主要晚期启动子(MLP) 负责晚期结构蛋白L1至L5的转录。尽管MLP在Ad基因组复制之前为最低活性,但只有在病毒基因组复制发生后,高毒性Ad晚期基因才能从mLP首先得到转录并翻译。晚期基因转录的这一顺式依赖性活化通常是DNA病毒的特征,如多瘤病毒和SV-40的生长中。DNA聚合酶和前末端蛋白对于Ad复制是重要的(不同于E4蛋白或IX蛋白)。它们的缺失可能极其不利于腺病毒载体晚期基因表达,以及该表达在细胞如APC中的毒性作用。

[0181] 腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区和任选的E1区中包含缺失。在一些情况下,这样的载体不具有缺失的Ad基因组的任何其他区域。腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区中包含缺失并在E1和E3区中包含缺失。在一些情况下,这样的载体不具有缺失的其他区域。腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区中包含缺失并在E1、E3以及部分或完全去除的E4区中包含缺失。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可在Ad基因组的E2b区中包含缺失并在E1和/或E4区中包含缺失。在一些情况下,这样的载体不含有其他缺失。腺病毒载体可在Ad基因组的E2a、E2b和/或E4区中包含缺失。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可缺失E2b区的E1和/或DNA聚合酶功能。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可缺失E2b区的E1和/或前末端蛋白功能。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可缺失E1、DNA聚合酶和/或前末端蛋白功能。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可具有E2b区和/或E1区的至少一部分。在一些情况下,这样的载体不是无内容腺病毒载体。就这点而言,载体的E2b区的DNA聚合酶和前末端蛋白功能均可能缺失。腺病毒载体可在腺病毒基因组的E1、E2b和/或100K区中具有缺失。腺病毒载体可包括E1、E2b和/或蛋白酶功能缺失的载体。在一些情况下,这样的载体不具有其他缺失。腺病毒载体可具有E1和/或E2b区缺失,而纤突基因已通过突变或其他改变(例如改变Ad向性)得到修饰。基因从E3或E4区的去除可被添加到所提及的任何腺病毒载体中。在某些实施方案中,腺病毒载体可以是无内容腺病毒载体。

[0182] Ad基因组的其他区域可以缺失。Ad基因组的特定区域中的“缺失”是指这样的特异

性DNA序列,其发生突变或被去除以便阻止由该区域编码的至少一种基因产物的表达和/或功能(例如,DNA聚合酶或前末端蛋白功能的E2b功能)。缺失包括编码蛋白质部分的外显子内的缺失以及启动子和前导序列内的缺失。特定区域内的缺失是指在Ad基因组的该区域内的至少一个碱基对的缺失。可缺失多于一个碱基对。例如,可从特定区域删除至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150个碱基对。缺失可以是Ad基因组的特定区域内的多于150、160、170、180、190、200、250或300个碱基对的缺失。这些缺失可阻止由该区域编码的基因产物的表达和/或功能。例如,Ad基因组的特定区域可包括一个或多个点突变,使得一种或多种编码的蛋白质是非功能性的。这样的突变包括被不同残基取代从而导致氨基酸序列的变化进而产生非功能性蛋白质的残基。Ad基因组中的示例性缺失或突变包括E1a、E1b、E2a、E2b、E3、E4、L1、L2、L3、L4、L5、TP、POL、IV和VA区中的一种或多种。可例如使用重组技术来制备缺失型腺病毒载体。

[0183] 可使用组成型表达E2b基因产物和可能已被删除的任何必需基因的产物的合适包装细胞系,成功地使本发明中使用的Ad载体生长至高滴度。可使用不仅组成型表达E1和DNA聚合酶蛋白而且还表达Ad前末端蛋白的HEK-293衍生的细胞。E.C7细胞可用于例如使腺病毒载体的高滴度原种生长。

[0184] 为了从自我繁殖的腺病毒载体删除关键基因,可首先使由靶基因编码的蛋白质在HEK-293细胞或类似细胞中与E1蛋白一起共表达。例如,可选择性利用组成型共表达时无毒的蛋白质(或可诱导表达的毒性蛋白质)。E1和E4基因在HEK-293细胞中的共表达是可能的(例如利用可诱导、非组成型的启动子)。可共表达E1和蛋白IX基因(一种病毒体结构蛋白)。E1、E4和蛋白IX基因的进一步共表达也是可能的。E1和100K基因可在反式互补细胞系中表达,E1和蛋白酶基因也同样可以。

[0185] 可使用用于使高滴度的E2b缺失的Ad颗粒生长的共表达E1和E2b基因产物的细胞系。有用的细胞系组成型表达大约140kDa的Ad-DNA聚合酶和/或大约90kDa的前末端蛋白。没有毒性、具有E1、DNA聚合酶和前末端蛋白的高水平、组成型共表达的细胞系(例如E.C7)是用于繁殖用于多次疫苗接种的Ad所期望的。这些细胞系允许缺失E1、DNA聚合酶和前末端蛋白的腺病毒载体的繁殖。

[0186] 可使用例如含有在适当的MOI(例如5)下感染有Ad载体病毒原种的E.C7细胞的组织培养板繁殖本发明的重组Ad,并将该重组Ad在37℃下温育40-96h。可收获感染的细胞,将该细胞重悬于10mM Tris-Cl(pH8.0)中,并进行声处理,并可通过两轮氯化铯密度离心来纯化病毒。含有病毒的条带可在柱上脱盐,可加入蔗糖或甘油,并且等分试样可储存在-80℃下。病毒可放置在被设计用来提高其稳定性的溶液如A195中。可测量原种的滴度(例如,通过测量裂解后病毒等分试样在260nm处的光密度)。包含整个重组E2b缺失型腺病毒载体的线性或圆形质粒DNA可转染到E.C7或类似细胞中,并在37℃下温育,直到病毒产生的证据存在(例如细胞病变效应)。来自细胞的条件培养基可用于感染更多的细胞以扩大纯化之前产生的病毒的量。可例如通过两轮氯化铯密度离心或选择性过滤来完成纯化。可使用可商购产品或定制的色谱柱通过色谱法来纯化病毒。

[0187] 本发明的组合物可包含足够的病毒以确保将被感染的细胞面对一定数目的病毒。因此,在各个实施方案中,本发明提供了重组Ad的原种,如不含RCA的重组Ad原种。病毒原种的滴度可以差异很大,这很大程度上取决于病毒基因型以及用来制备它们的方案和细胞

系。病毒原种可具有至少约 10^6 、 10^7 或 10^8 pfu/mL或更高如至少约 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} pfu/mL的滴度。根据重组病毒和包装细胞系的性质,本发明的病毒原种可具有甚至约 10^{13} 个颗粒/mL或更高的滴度。

[0188] 复制缺陷型腺病毒载体(例如,SEQ.ID.NO.:3)可在合适的位置处包含编码靶抗原、其片段或其变体的序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体(例如,SEQ.ID.NO.:3)可在取代编码CEA或变体CEA的核酸序列(例如,SEQ.ID.NO.:1)的位置处包含编码本文所述的靶抗原或其片段、变体或变体片段的序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体(例如,SEQ.ID.NO.:3)可在取代编码CEA或变体CEA的核酸序列(例如,SEQ.ID.NO.:2)的位置处包含编码本文所述的靶抗原或其片段、变体或变体片段的序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体(例如,SEQ.ID.NO.:3)可在取代编码MUC1或变体MUC1的核酸序列(例如,SEQ.ID.NO.:5、SEQ.ID.NO.:6或SEQ.ID.NO.:9)的位置处包含编码本文所述的靶抗原或其片段、变体或变体片段的序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体(例如,SEQ.ID.NO.:3)可在取代编码T或变体T的核酸序列(例如,SEQ.ID.NO.:7或SEQ.ID.NO.:8)的位置处包含编码本文所述的靶抗原或其片段、变体或变体片段的序列。

[0189] 编码抗原靶标的多核苷酸和变体

[0190] 本公开内容进一步提供了核酸序列(本文也称为多核苷酸),其编码一种或多种感兴趣的靶抗原或其片段或变体。因此,本发明提供了编码来自如本文进一步描述的任何来源的靶抗原的多核苷酸,包含这样的多核苷酸的载体和用这样的表达载体转化或转染的宿主细胞。为了表达期望的靶抗原多肽,可将编码该多肽的核苷酸序列或功能等同物插入到合适的Ad载体中(例如,使用重组技术)。合适的腺病毒载体可含有对于所插入的编码序列的转录和翻译所必需的元件以及任何所需的连接体。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有编码感兴趣的多肽的序列和适当的转录和翻译控制元件的这些腺病毒载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。

[0191] 多核苷酸可包含天然序列(即,编码本发明的靶抗原多肽/蛋白质/表位或其一部分的内源序列),或者可包含编码这样的序列的变体、片段或衍生物的序列。多核苷酸序列可编码靶抗原蛋白。在一些实施方案中,多核苷酸代表被优化用于在特定细胞类型中表达的新基因序列,该基因序列可与天然核苷酸序列或变体基本不同,但编码相似的蛋白质抗原。

[0192] 在其他相关实施方案中,多核苷酸变体与编码蛋白质(例如,感兴趣的靶抗原)的天然序列具有基本的同一性,例如,与编码多肽的天然多核苷酸序列相比,多核苷酸变体包含至少70%的序列同一性,优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的序列同一性(例如,使用标准参数的BLAST分析)。通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可适当地调整这些值以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应同一性。与由天然多核苷酸序列编码的蛋白质序列相比,多核苷酸可编码包含例如至少70%的序列同一性,优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的序列同一性的蛋白质。

[0193] 多核苷酸可包含至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个或

更多个编码多肽(例如,靶蛋白抗原)的连续核苷酸,以及其间的所有中间长度。在上下文中,“中间长度”是指引用值之间的任何长度,如16、17、18、19等;21、22、23等;30、31、32等;50、51、52、53等;100、101、102、103等;150、151、152、153等;包括200-500;500-1,000等的所有整数。可在一端或两端利用未在编码多肽,如表位或异源靶蛋白的天然序列中发现的附加核苷酸对多核苷酸序列进行延伸。该附加序列在所公开序列的任一端或在所公开序列的两端可由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸或更多个核苷酸组成。

[0194] 无论编码序列本身的长度如何,多核苷酸均可与其他DNA序列,如启动子、表达控制序列、多聚腺苷化信号、附加的限制酶位点、多克隆位点、其他编码区段等组合,使得它们的总长度可以差异很大。因此,考虑可使用几乎任何长度的核酸片段,其总长度优选受到制备的容易程度和在预期重组DNA方案中的使用的限制。考虑将总长度约1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、约500、约200、约100、约50个碱基对长度等(包括所有中间长度)的说明性多核苷酸区段用于本发明的许多实施中。

[0195] 诱变方法如位点特异性诱变可用于制备靶抗原序列。可通过对编码多肽序列的潜在多核苷酸进行诱变来实现多肽序列中的特异性修饰。位点特异性诱变可用于通过使用编码所需突变的DNA序列的寡核苷酸序列以及足够数目的相邻核苷酸来提供足够大小和序列复杂性的引物序列从而在穿过的缺失连接处的两侧形成稳定的双链体来制备突变体。例如,可使用包含约14至约25个核苷酸左右长度的引物,该引物在被改变的序列连接处的两侧具有约5至约10个残基。可在选择的多核苷酸序列中进行突变以改善、改变、减少、修饰或以其他方式改变多核苷酸的性质,并且/或者改变所编码的多肽的性质、活性、组成、稳定性或一级序列。

[0196] 多核苷酸序列的诱变可用于改变所编码多肽的一种或多种性质,如包含在多肽中的表位的免疫原性或靶抗原的致癌性。用来测试多肽的免疫原性的测定包括但不限于T细胞的细胞毒性测定(CTL/铬释放测定)、T细胞增殖测定、细胞内细胞因子染色、ELISA、ELISpot等。可使用用于获得肽的序列变体和编码它们的DNA序列的其他方法。例如,可用诱变剂如羟胺处理编码所需肽序列的重组载体,以获得序列变体。

[0197] 可通过例如用化学手段直接合成片段容易地制备编码本发明多肽的多核苷酸区段或片段。可通过应用核酸复制技术如PCR通过将选择的序列引入到用于重组生产的重组载体中来获得片段。

[0198] 多种载体/宿主系统可用于包含并产生多核苷酸序列。示例性系统包括微生物,如用重组细菌噬菌体、质粒或粘粒DNA载体转化的细菌;用酵母载体转化的酵母;感染有病毒载体(例如,杆状病毒(baculovirus))的昆虫细胞系统;用病毒载体(例如,花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV);烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV))或细菌载体(例如, Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0199] 存在于Ad载体中的控制元件或调控序列可包括载体增强子、启动子以及5'和3'非翻译区的那些非翻译区。这些元件的强度和特异性可以不同。根据所使用的载体系统和宿主,可使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。例如,可将编码感兴趣的多肽的序列连接到由晚期启动子和三联前导序列组成的Ad转录/翻译复合体中。病毒基因组的非必需E1或E3区中的插入可用于获得能够在感染的宿主细胞中表达多肽

的活的病毒。此外,转录增强子,如劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)增强子可用于增强哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0200] 特异性起始信号也可用于实现编码感兴趣多肽的序列的更有效的翻译(例如,ATG起始密码子和相邻序列)。外源翻译元件和起始密码子可以是各种来源(天然的和合成的)。可通过包含适用于所使用的特定细胞系统的增强子来增强表达的效率。还可并入用于转录或翻译的特异性终止序列,以便实现编码所选多肽的序列的有效翻译。

[0201] 可使用用于检测和测量多核苷酸编码的产物(例如,靶抗原)的表达的多种方案(例如,使用对产物特异的多克隆或单克隆抗体)。实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和荧光激活细胞分选术(FACS)。利用单克隆抗体对给定多肽上两个非干扰表位的反应性的基于双位点单克隆的免疫测定在一些应用中可能是优选的,但也可采用竞争性结合测定。

[0202] Ad载体可包含可被检测或挑选出来的产物,诸如,其产物可诸如通过荧光、显色或荧光底物上的酶活性等检测到或通过生长条件被挑选出来的报告基因。示例性的报告基因包括绿色荧光蛋白(GFP)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶、新霉素磷酸转移酶、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)和人生长激素(HGH)。示例性的可选择标记包括耐药性,如新霉素(G418)、潮霉素等。

[0203] Ad载体还可包含启动子或表达控制序列。启动子的选择将部分取决于靶向细胞类型和所需控制的程度或类型。适合于本发明的上下文的启动子包括但不限于组成型、诱导型、组织特异性、细胞类型特异性、时间特异性或事件特异性启动子。组成型或非特异性启动子的实例包括SV40早期启动子、SV40晚期启动子、CMV早期基因启动子、牛乳头瘤病毒启动子和腺病毒启动子。除了病毒启动子之外,细胞启动子也可适用于本发明的上下文。特别地,所谓管家基因的细胞启动子是有用的(例如, β -肌动蛋白)。病毒启动子通常是比细胞启动子更强的启动子。也可使用诱导型启动子。这些启动子包括可被地塞米松诱导的MMTV LTR、可被重金属诱导的金属硫蛋白以及可被cAMP诱导的具有cAMP应答元件的启动子、热休克启动子。通过使用诱导型启动子,可将核酸递送至细胞并且核酸将保持静止,直到诱导物的添加。这允许进一步控制感兴趣的蛋白质的产生时间。例如,可使用事件型特异性启动子(例如,HIV LTR),其仅在事件,如肿瘤发生或病毒感染发生后是活性的或上调的。HIV LTR启动子是无活性的,除非tat基因产物存在(在病毒感染后发生)。一些事件型启动子也是组织特异性的。优选的事件型特异性启动子包括在病毒感染后激活的启动子。

[0204] 启动子的实例包括 α -甲胎蛋白、 α -肌动蛋白、myo D、癌胚抗原、VEGF受体的启动子;FGF受体;TEK或tie 2;tie;尿激酶受体;E选择蛋白和P选择蛋白;VCAM-1;内皮糖蛋白;内皮唾液酸蛋白; α V- β 3整联蛋白;内皮素1;ICAM-3;E9抗原;冯维勒布兰德因子;CD44;CD40;血管内皮钙粘着蛋白;刻缺蛋白4,高分子量黑素瘤相关抗原;前列腺特异性抗原-1,probasin,FGF受体,VEGF受体,erb B2;erb B3;erb B4;MUC-1;HSP-27;int-1;int-2,CEA,HBEGF受体;EGF受体;酪氨酸酶,MAGE,IL-2受体;前列腺酸性磷酸酶,probasin,前列腺特异性膜抗原, α -晶体蛋白,PDGF受体,整联蛋白受体, α -肌动蛋白,SM1和SM2肌球蛋白重链,钙调蛋白-h1,SM22 α -血管紧张肽受体,IL-1,IL-2,IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-8,IL-9,IL-10,IL-11,IL-12,IL-13,IL-14,免疫球蛋白重链,免疫球蛋白轻链和CD4。

[0205] 可插入阻抑物序列、负调节基因或组织特异性沉默子以降低多核苷酸的非特异性

表达。可在启动子区域插入多个阻抑物元件。转录的抑制与阻抑物元件的取向或距启动子的距离无关。一种类型的阻抑物序列是绝缘子序列。这样的序列抑制转录并且可抑制背景转录。负调节元件可位于许多不同基因的启动子区域中。阻抑物元件可在诸如类固醇等因子不存在的情况下起到转录阻抑物的作用,如同卵清蛋白基因的启动子区域中的NSE一样。这些负调节元件可结合来自输卵管的特异性蛋白复合体,其中没有一种对类固醇敏感。三种不同的元件位于卵清蛋白基因的启动子中。对应于这些元件的部分的寡核苷酸可抑制TK受体的病毒转录。其中一个沉默子元件与其他基因(TCTCTCCNA (SEQ ID NO:11))中的沉默子共享序列同一性。

[0206] 可将增强所需靶抗原的表达的元件并入到本文所述的Ad载体的核酸序列中。示例性元件包括内部核糖体结合位点(IRES)。IRES可提高翻译效率。同样,其他序列可增强表达。对于一些基因,尤其是在5'端的序列可抑制转录和/或翻译。这些序列通常是可形成发夹结构的回文序列。在一些情况下,删除将要递送的核酸中的这类序列。可测定转录物或翻译产物的表达水平以确认或确定哪些序列影响表达。可通过任何已知的方法,包括RNA印迹杂交、RNA酶探针保护等,来测定转录水平。可通过任何已知的方法,包括ELISA来测定蛋白质水平。

[0207] 抗原特异性免疫治疗和疫苗

[0208] 本公开内容提供了利用这样的载体和如本文提供的其他载体的对MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的单抗原或组合抗原免疫。本公开内容提供了针对MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的治疗疫苗。本公开内容提供了针对MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的预防性疫苗。此外,在各个实施方案中,本文提供的组合物和方法可导致临床反应,如改变的疾病进展或预期寿命。

[0209] 编码多种抗原的Ad5[E1-]载体可用于将95%的离体暴露的DC有效转导至高滴度的载体。重要的是,本发明人已发现DC中的外来基因表达水平随着载体的感染复数(MOI)的增加而增加。感染有Ad5[E1-]载体的DC可编码在混合淋巴细胞反应中具有诱导抗原特异性CTL应答的倾向、具有增强的抗原呈递能力和/或具有改善的启动T细胞增殖的能力的多种抗原(包括肿瘤抗原MART-1、MAGE-A4、DF3/MUC1、p53、hugp100黑素瘤抗原、多瘤病毒中间T抗原(polyoma virus middle-T antigen))。用先前转导了编码肿瘤特异性抗原的Ad5载体的树突细胞(DC)使动物免疫可用于在用表达相应抗原的肿瘤细胞进行攻击时诱导对动物的显著水平的保护。有趣的是,肿瘤内注射编码IL-7的Ad比注射转导有编码IL-7的Ad5载体的DC在诱导抗肿瘤免疫方面效果更差。本公开内容考虑通过Ad5载体进行DC的离体转导。离体DC转导策略可用于诱导受体宿主耐受性。例如,Ad5介导的CTLA4Ig向DC中的递送可阻断DC CD80与存在于T细胞上的CD28分子的相互作用。

[0210] 与DC相互作用的Ad5载体衣壳可触发数个有益的反应,从而可增强DC呈递由Ad5载体编码的抗原的倾向。例如,未成熟的DC尽管专门用于抗原摄取,但却是T细胞活化的效率相对低的效应物。DC成熟与DC驱动T细胞免疫的增强的能力相一致。在一些情况下,本发明的组合物和方法利用Ad5感染,导致直接诱导DC成熟。来自小鼠的未成熟骨髓衍生的DC的Ad载体感染可上调通常与DC成熟相关联的细胞表面标志物(MHC I和MHC II、CD40、CD80、CD86和ICAM-1)以及下调CD11c(在骨髓DC成熟后下调的整联蛋白)。在一些情况下,Ad载体感染触发由DC产生IL-12,IL-12是DC成熟的标志物。不受理论的约束,这些事件可能是由于Ad5

触发的NF- κ B途径的激活而引起。如通过成熟的CD83+人DC(衍生自外周血单核细胞)所证明的,成熟的DC可被Ad载体有效转导,并且不会失去其在较低MOI下刺激幼稚T细胞增殖的功能潜力。然而,成熟的DC也可比未成熟的DC较少感染。可例如使用CD40L受体作为病毒载体受体,而不是使用常规的CAR受体感染机制,将衣壳蛋白的修饰用作通过Ad载体以及增强功能成熟优化DC的感染的策略。

[0211] 在各个实施方案中,本发明的组合物和方法包括在技术安全范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体MUC1、T和CEA疫苗效果。在各个实施方案中,本发明的组合物和方法包括在技术安全范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体MUC1c、T和CEA疫苗效果。在各个实施方案中,本发明的组合物和方法包括在技术安全范围内增加的总存活期(OS)的Ad5[E1-,E2b-]载体MUC1n、T和CEA疫苗效果。

[0212] 在一些实施方案中,抗原靶标与良性肿瘤相关。在一些实施方案中,靶向的抗原与癌前肿瘤相关。

[0213] 在一些实施方案中,靶向的抗原与癌、原位癌、转移性肿瘤、成神经细胞瘤、肉瘤、肌肉瘤、平滑肌肉瘤、成视网膜细胞瘤、肝细胞瘤、横纹肌肉瘤、浆细胞瘤、腺瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤或骨肉瘤相关。在一些实施方案中,靶向的抗原与特定类型的癌症如神经系统癌症、脑癌、甲状腺癌、头颈癌、黑素瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金病、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、肾细胞癌、胰腺癌、食管癌、肺癌、间皮瘤、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、子宫癌、生殖细胞肿瘤、睾丸癌、胃癌或其他癌症,或其任何临床(例如,TNM、组织病理学、分期或分级系统或其组合)或分子亚型相关。在一些实施方案中,靶向的抗原与癌症的特定的临床或分子亚型相关。举例来说,乳腺癌可分为至少四种分子亚型,包括腔A型、腔B型、三阴性/基底样和HER2型。举例来说,前列腺癌可分为TNM、格里森评分或PSA蛋白的分子表达。

[0214] 如上所述,本发明的腺病毒载体包含编码一种或多种感兴趣的靶蛋白或抗原的核酸序列。就这点而言,载体可含有编码1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或更多种不同的感兴趣的靶抗原的核酸。靶抗原可以是全长蛋白质,或者可以是其片段(例如,表位)。腺病毒载体可含有编码来自一种感兴趣的靶蛋白的多个片段或表位的核酸序列,或者可含有来自许多不同的感兴趣的靶蛋白的一个或多个片段或表位。靶抗原可包含任何物质,其中期望针对该物质产生免疫应答,但通常,靶抗原是蛋白质。靶抗原可包含全长蛋白质、蛋白质的亚基、诱导免疫应答的蛋白质的同种型或其片段(即,免疫原性片段)。可对靶抗原或其片段进行修饰,例如,以便降低靶抗原的一种或多种生物活性或增强其免疫原性。靶抗原或靶蛋白可以是MUC1、MUC1c、MUC1n、T、CEA或其任意组合。

[0215] 在某些实施方案中,免疫原性片段与MHC I类或II类分子结合。免疫原性片段可“结合”MHC I类或II类分子,条件是使用本领域已知的任何测定可检测到这样的结合。例如,可通过监测促进¹²⁵I标记的 β -2-微球蛋白(β -2m)向MHC I类/ β 2m/肽异三聚体复合物中并入的能力来间接评估多肽与MHC I类结合的能力。或者,可采用本领域已知的功能性肽竞争测定。通常可使用熟知的技术来鉴定多肽的免疫原性片段。用于鉴定免疫原性片段的代表性技术包括筛选多肽与抗原特异性抗血清和/或T细胞系或克隆反应的能力。特定靶多肽的免疫原性片段是以基本上不低于全长靶多肽的反应性的水平与这样的抗血清和/或T细

胞反应的片段(例如,在ELISA和/或T细胞反应性测定中)。换句话说,免疫原性片段可以以类似于或高于全长多肽的反应性的水平在这样的测定内进行反应。可使用本领域已知的方法来进行这样的筛选。

[0216] 在一些实施方案中,本发明的病毒载体包含编码可调节免疫应答的一种或多种蛋白质、其变体、其融合物或其片段的异源核酸序列。

[0217] 在一些实施方案中,本发明的病毒载体编码针对特异性抗原如炭疽保护性抗原的一种或多种抗体,从而允许被动免疫治疗。在一些实施方案中,本发明的病毒载体包含编码具有治疗效果(例如,抗病毒、抗细菌、抗寄生或抗肿瘤功能)的一种或多种蛋白质的异源核酸序列。

[0218] 在一些实施方案中,第二代E2b缺失型腺病毒载体包含异源核酸序列。

[0219] 在一些实施方案中,异源核酸序列是CEA、MUC1、MUC1c、MUC1n、T,其变体、一部分或任意组合。

[0220] 靶抗原包括但不限于衍生自多种肿瘤蛋白的抗原。在一些实施方案中,肿瘤蛋白的部分或变体用作靶抗原。在一些实施方案中,用作靶抗原的肿瘤蛋白的部分或变体具有修饰的,例如,增加的对肿瘤蛋白或包含肿瘤蛋白的细胞产生免疫应答的能力。本发明的疫苗可针对抗原进行疫苗接种。疫苗也可靶向表位。抗原可以是肿瘤细胞抗原。表位可以是肿瘤细胞表位。这样的肿瘤细胞表位可衍生自很多种肿瘤抗原,如来自突变引起的肿瘤的抗原、共享的肿瘤特异性抗原、分化抗原和在肿瘤中过表达的抗原。肿瘤相关抗原(TAA)可以是由宿主非正常表达的抗原;它们可以是由宿主正常表达的分子的突变、截短、错误折叠或其他方式的异常显示;它们可与正常表达但以异常高水平表达的分子相同;或者它们可在异常的情形或环境中表达。肿瘤相关抗原可以是,例如,蛋白质或蛋白质片段、复合碳水化合物、神经节苷脂、半抗原、核酸、其他生物分子或其任意组合。

[0221] 用于本发明的说明性肿瘤蛋白包括但不限于以下蛋白中的任一种或多种:WT1、HPV E6、HPV E7、p53、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、NY-ESO-1、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、Her2/neu、BRCA1、Brachyury、Brachyury (TIVS7-2,多态性)、Brachyury (IVS7 T/C多态性)、T Brachyury、T、hTERT、hTERT、iCE、MUC1、MUC1 (VNTR多态性)、MUC1c、MUC1n、MUC2、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、WT1、AFP、 β -连环蛋白/m、胱天蛋白酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、膜联蛋白II、CDC27/m、TPI/mbcr-abl、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR α 和TEL/AML1。在一些实施方案中,病毒载体包含编码选自下组的修饰的多肽的靶抗原序列:WT1、HPV E6、HPV E7、p53、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、NY-ESO-1、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、Her2/neu、BRCA1、Brachyury、Brachyury (TIVS7-2,多态性)、Brachyury (IVS7 T/C多态性)、TBrachyury、T、hTERT、hTERT、iCE、MUC1、MUC1 (VNTR多态性)、MUC1c、MUC1n、MUC2、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、WT1、AFP、 β -连环蛋白/m、胱天蛋白酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-

2、MUM-3、肌球蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、膜联蛋白II、CDC27/m、TPI/mbr-ab1、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR α 和TEL/AML1,其中该多肽或其片段与所描述的序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性。

[0222] 用于本发明的说明性肿瘤蛋白包括但不限于下组的任一种或多种:CEA、人表皮生长因子受体2(HER2/neu)、人表皮生长因子受体3(HER3)、人乳头瘤病毒(HPV)、MUC1、前列腺特异性抗原(PSA)、 α -辅肌动蛋白-4、ARTC1、CAR-ABL融合蛋白(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、 β -连环蛋白、Cdc27、CDK4、CDKN2A、COA-1、dek-can融合蛋白、EFTUD2、延伸因子2、ETV6-AML1融合蛋白、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-岩藻糖基转移酶融合蛋白、HLA-A2d、HLA-A11d、hsp70-2、KIAA0205、MART2、ME1、MUM-1f、MUM-2、MUM-3、neo-PAP、肌球蛋白I类、NFYC、OGT、OS-9、p53、pml-RAR α 融合蛋白、PRDX5、PTPRK、K-ras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1融合蛋白或SYT-SSX2融合蛋白、TGF- β RII、丙糖磷酸异构酶、BAGE-1、GnTVf、HERV-K-MEL、KK-LC-1、KM-HN-1、LAGE-1、MAGE-A9、MAGE-C2、粘蛋白k(mucink)、NA-88、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-2、SSX-4、TAG-1、TAG-2、TRAG-3、TRP2-INT2g、XAGE-1b、gp100/Pmel17、激肽释放酶4、乳腺珠蛋白-A、Melan-A/MART-1、NY-BR-1、OA1、PSA、RAB38/NY-MEL-1、TRP-1/gp75、TRP-2、酪氨酸酶、亲脂素、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BCMA、BING-4、CPSF、细胞周期蛋白D1、DKK1、ENAH(hMena)、EP-CAM、EphA3、EZH2、FGF5、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IL13R α 2、肠羧基酯酶、 α 甲胎蛋白、M-CSFT、MCSP、mdm-2、MMP-2、MUC1、p53、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RNF43、RU2AS、分离蛋白1、SOX10、STEAP1、存活蛋白、端粒酶和/或VEGF。

[0223] 肿瘤相关抗原可以是来自与人类恶性肿瘤相关的感染原的抗原。与人类恶性肿瘤相关的感染原的实例包括爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus)、人疱疹病毒-8(Human herpesvirus-8)、人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus)、人乳头瘤病毒、人类T细胞白血病病毒、肝吸虫(liver flukes)和埃及血吸虫(*Schistosoma haematobium*)。

[0224] CEA抗原靶标

[0225] CEA代表了用于免疫治疗的有吸引力的靶抗原,因为其在几乎所有的结肠直肠癌和胰腺癌中都过表达,并且也被一些肺癌和乳腺癌以及不常见的肿瘤如甲状腺髓样癌所表达,但除在胃肠上皮细胞中低水平表达外,在身体的其他细胞中均不表达。CEA含有可以以MHC限制方式被T细胞识别的表位。

[0226] 本发明人已经发现,尽管存在预先存在的或诱导的Ad5中和抗体,但用编码肿瘤抗原CEA的Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)进行的多次同源免疫在小鼠中诱导具有抗肿瘤活性的CEA特异性细胞介导的免疫(CMI)应答。在目前的I/II期研究中,用逐渐递增剂量的Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)使晚期结肠直肠癌患者队列免疫。尽管在大多数(61.3%)的患者中存在预先存在的Ad5免疫力,但仍观察到CEA特异性CMI应答。重要的是,出现了最小的毒性,并且总患者存活期(在12个月时为48%)是相似的,不论预先存在的Ad5中和抗体滴度如何。结果证明,在癌症患者中,新型Ad5[E1-,E2b-]基因递送平台在天然获得和免疫诱导的Ad5特异性免疫力的环境中均产生对肿瘤抗原CEA的显著的CMI应答。

[0227] CEA抗原特异性CMI可以是,例如,大于10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、5000、10000个或更多个IFN- γ 斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 个外周血

单核细胞 (PBMC)。在一些实施方案中,在具有大于50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000、12000、15000或更高的预先存在的逆Ad5中和抗体滴度的人类受试者中产生免疫应答。免疫应答可包括如本文所述的细胞介导的免疫和/或体液免疫。免疫应答可通过下组中的一种或多种测定来进行测量:如本文所述并达到可被本领域技术人员实现的程度的细胞内细胞因子染色 (ICS)、ELISpot、增殖测定、细胞毒性T细胞测定 (包括铬释放或等同测定) 和使用任何数目的聚合酶链反应 (PCR) 的基因表达分析或基于RT-PCR的测定,以及本领域已知的用于测量免疫应答的任何其他合适的测定。

[0228] 在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与野生型多肽亚基具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的亚基的修饰序列。

[0229] 免疫原性多肽可以是突变的CEA或其片段。在一些实施方案中,免疫原性多肽包括在610位具有Asn->Asp置换的突变的CEA。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与免疫原性多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括SEQ.ID.NO:1的序列。

[0230] 在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括与SEQ.ID.NO:1具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的序列或通过备选密码子替换从SEQ.ID.NO:1生成的序列。在一些实施方案中,与野生型人CEA序列相比,由腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单个氨基酸置换或缺失。

[0231] 在一些实施方案中,免疫原性多肽包含来自SEQ.ID.NO.:2或SEQ.ID.NO.:2的修饰形式的序列,例如包含最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单个氨基酸置换或缺失。

[0232] CEA基因家族成员基于序列相似性、发育表达模式及其生物学功能被细分为三个亚组:含有十二种基因 (CEACAM1、CEACAM3-CEACAM8、CEACAM16和CEACAM18-CEACAM21) 的CEA相关细胞粘附分子 (CEACAM) 亚组,含有十一种密切相关基因 (PSG1-PSG11) 的妊娠特异性糖蛋白 (PSG) 亚组和十一种假基因 (CEACAMP1-CEACAMP11) 的亚组。CEACAM亚组的大多数成员具有相似的结构,其由细胞外Ig样结构域 (由单个N末端V-set结构域组成,与免疫球蛋白可变结构域具有结构同源性),以及随后的不同数目的A或B亚型的C2-set结构域、跨膜结构域和细胞质结构域组成。CEACAM亚组的两个成员 (CEACAM16和CEACAM20) 在其结构的组织方面显示出一些例外。CEACAM16在其N末端和C末端含有两个Ig样V型结构域,而CEACAM20含有截短的Ig样V型1结构域。CEACAM分子可经由其跨膜结构域锚定到细胞表面 (CEACAM5到CEACAM8),或直接与糖磷脂酰肌醇 (GPI) 脂质部分连接 (CEACAM5、CEACAM18到CEACAM21)。

[0233] CEA家族成员在不同的细胞类型中表达并具有广泛的生物学功能。CEACAM主要发现在大多数上皮细胞上并存在于不同的白细胞上。在人类中,CEA家族的祖先成员CEACAM1在上皮细胞和内皮细胞的顶侧上以及在淋巴细胞和骨髓细胞上表达。CEACAM1通过血友病 (CEACAM1至CEACAM1) 以及雌雄异体 (例如,CEACAM1至CEACAM5) 相互作用来介导细胞与细胞的粘附。此外,CEACAM1涉及许多其他生物学过程,如血管生成、细胞迁移和免疫功能。CEACAM3和CEACAM4表达主要限于粒细胞,并且它们能够传递包括奈瑟氏球菌属

(Neisseria)、莫拉氏菌属 (Moraxella) 和嗜血菌属 (Haemophilus) 物种在内的数种细菌病原体的摄取和破坏。

[0234] 因此,在各个实施方案中,本发明的组合物和方法涉及增强对CEA的免疫应答,该CEA选自CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM8、CEACAM16、CEACAM18、CEACAM19、CEACAM20、CEACAM21、PSG1、PSG2、PSG3、PSG4、PSG5、PSG6、PSG7、PSG8、PSG9和PSG11。可使用本发明的方法和组合物增强对表达或过表达一种或多种CEA的细胞,例如癌细胞的免疫应答。在一些实施方案中,一种或多种CEA在这样的癌细胞中的过表达超过在非癌细胞中的过表达5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍或更多倍。

[0235] 粘蛋白家族抗原靶标

[0236] 人类粘蛋白家族 (MUC1至MUC21) 包括分泌粘蛋白和跨膜粘蛋白,它们在身体中上皮表面上形成保护性粘液屏障方面发挥作用。这些蛋白质的功能在于保护呼吸道内的上皮、胃肠道以及重要器官例如乳腺、肝、胃、胰腺和肾中的内衬导管。

[0237] MUC1 (CD227) 是在大多数人类癌症和若干血液恶性肿瘤中过表达的TAA。MUC1 (GenBank:X80761.1,NCBI:NM_001204285.1) 激活已知参与人类疾病的许多重要细胞途径。MUC1是由在若干人类癌症中通常过表达的两个亚基形成的异二聚体蛋白。MUC1经历自体溶解以生成两个亚基MUC1n和MUC1c,这两个亚基反过来形成稳定的非共价异二聚体。

[0238] MUC1 C末端亚基 (MUC1c) 可包含58aa细胞外结构域 (ED)、28aa跨膜结构域 (TM) 和72aa细胞质结构域 (CD)。MUC1c还可含有可允许MUC1二聚化的“CQC”基序,并且还可赋予细胞致癌功能。在一些情况下,MUC1可通过经由MUC1c诱导细胞信号传导来赋予致癌功能。MUC1c可与EGFR、ErbB2和其他受体酪氨酸激酶相互作用,从而有助于PI3K→AKT和MEK→ERK细胞途径的激活。在细胞核中,MUC1c激活Wnt/ β -连环蛋白、STAT和NF- κ B RelA细胞途径。在一些情况下,MUC1可通过经由MUC1n诱导细胞信号传导来赋予致癌功能。MUC1 N末端亚基 (MUC1n) 可包含可被糖基化的可变数目的20个氨基酸的串联重复序列。MUC1在腺上皮细胞表面正常表达,而在癌中过表达并被异常糖基化。MUC1是可用作肿瘤免疫治疗靶标的TAA。已经进行并且正在进行数项临床试验以评估MUC1在免疫治疗疫苗中的用途。重要的是,这些试验指示,采用MUC1靶向的免疫治疗是安全的并且可提供生存益处。

[0239] 然而,临床试验还显示,MUC1是相对差的免疫原。为了克服这一点,本发明人已在MUC1癌蛋白 (MUC1-C或MUC1c) 的C末端区域中鉴定出T淋巴细胞免疫增强子肽序列。与天然肽序列相比,其修饰的MUC1-C中的激动剂 (a) 在较低肽浓度下结合HLA-A2, (b) 显示出对HLA-A2的较高的亲和力, (c) 当与抗原呈递细胞一起使用时,比与天然肽一起使用诱导通过T细胞产生更多的IFN- γ , 以及 (d) 能够更有效地从癌症患者生成MUC1特异性人类T细胞系。重要的是,对于使用天然表位脉冲的靶标的裂解以及在表达MUC1的HLA-A2人类肿瘤细胞的裂解中,使用激动剂表位生成的T细胞系比用天然表位生成的T细胞系更有效。此外,本发明人已鉴定出MUC1-C的其他CD8+细胞毒性T淋巴细胞免疫增强子激动剂序列表位。

[0240] 本公开内容提供了对免疫增强子能力进行修饰的有效的MUC1-C (mMUC1-C或MUC1-C或MUC1c)。本公开内容提供了对免疫增强子能力进行修饰的有效的MUC1-C,并将其并入重组Ad5[E1-,E2b-]平台中以产生新的且更有效的免疫治疗疫苗。例如,免疫治疗疫苗可以是用于治疗表达MUC1的癌症或感染性疾病的Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C。

[0241] 翻译后修饰在控制体内和人类疾病中的蛋白质功能方面发挥重要作用。例如,除

了上文讨论的蛋白酶解切割之外,MUC1还可在特定的氨基酸残基处具有若干种翻译后修饰如糖基化、唾液酸化、棕榈酰化或其组合。本文提供了靶向MUC1的糖基化、唾液酸化、磷酸化或棕榈酰化修饰的免疫治疗。

[0242] MUC1可被高度糖基化(碳水化合物和唾液酸以不同程度在每个串联重复序列内的丝氨酸和苏氨酸残基上进行N-连接和O-连接,在单糖基化到五糖基化的范围内)。在具有3,4-连接的GlcNAc的乳腺癌中具有差异化的O-糖基化。N-糖基化由分泌形式MUC1/SEC中的高甘露糖、酸性复合型和杂合聚糖,以及跨膜形式MUC1/TM.4中的中性复合型组成。本公开内容提供了靶向MUC1的差异化O-糖基化形式的免疫治疗。

[0243] 此外,MUC1可被唾液酸化。来自肾癌和乳腺癌细胞的膜释放的(Membrane-shed)糖蛋白具有优先唾液酸化的核心1结构,而来自相同组织的分泌形式主要显示核心2结构。O-糖基化含量在具有末端岩藻糖和半乳糖、2-和3-连接的半乳糖、3-和3,6-连接的GalNAc-ol和占优势的4-连接的GlcNAc的这些组织中是重叠的。本公开内容提供了靶向MUC1的各种唾液酸化形式的免疫治疗。CQC基序中的半胱氨酸残基上的双棕榈酰化对于从核内体返回质膜的循环利用是必需的。本公开内容提供了靶向MUC1的各种棕榈酰化形式的免疫治疗。

[0244] 磷酸化可影响MUC1诱导对人类健康重要的特异性细胞信号传导应答的能力。本公开内容提供了靶向MUC1的各种磷酸化形式的免疫治疗。例如,MUC1可在C末端结构域中的酪氨酸和丝氨酸残基上被磷酸化。C末端结构域中酪氨酸上的磷酸化可增强MUC1和 β -连环蛋白的核定位。通过PKC δ 的磷酸化可诱导MUC1与 β -连环蛋白/CTNNB1的结合并减少 β -连环蛋白/E-钙粘着蛋白复合体的形成。Src介导的MUC1的磷酸化可抑制与GSK3B的相互作用。Src和EGFR介导的MUC1在Tyr-1229上的磷酸化可增强与 β -连环蛋白/CTNNB1的结合。GSK3B介导的MUC1在Ser-1227上的磷酸化可减少这种相互作用,但恢复 β -钙粘着蛋白/E-钙粘着蛋白复合体的形成。PDGFR介导的MUC1的磷酸化可增强MUC1CT和CTNNB1的核共定位。本公开内容提供了靶向已知调控其细胞信号传导能力的MUC1、MUC1c和MUC1n的不同磷酸化形式的免疫治疗。

[0245] 本公开内容提供了调节MUC1c细胞质结构域及其在细胞中的功能的免疫治疗。本公开内容提供了包括调节MUC1c中的CQC基序的免疫治疗。本公开内容提供了包括调节MUC1c的细胞外结构域(ED)、跨膜结构域(TM)、细胞质结构域(CD)或其组合的免疫治疗。本公开内容提供了包括调节MUC1c通过EGFR、ErbB2或其他受体酪氨酸激酶诱导细胞信号传导的能力的免疫治疗。本公开内容提供了包括调节MUC1c诱导PI3K $\rightarrow$ AKT、MEK $\rightarrow$ ERK、Wnt/ β -连环蛋白、STAT、NF- κ B RelA细胞途径或其组合的能力的免疫治疗。在一些实施方案中,MUC1c免疫治疗可进一步包括CEA。

[0246] 本公开内容还提供了调节MUC1n及其细胞功能的免疫治疗。本公开内容还提供了包括MUC1n的串联重复序列、MUC1n的串联重复序列上的糖基化位点或其组合的免疫治疗。在一些实施方案中,MUC1n免疫治疗进一步包括CEA。

[0247] 本公开内容还提供了包含MUC1n、MUC1c、CEA或其组合的疫苗。本公开内容提供了包含MUC1c和CEA的疫苗。本公开内容还提供了靶向MUC1n和CEA的疫苗。在一些实施方案中,抗原组合包含在如本文所提供的一种载体中。在一些实施方案中,抗原组合包含在如本文所提供的单独的载体中。

[0248] 本发明涉及包含编码免疫原性多肽的序列的血清型5的复制缺陷型腺病毒载体。

免疫原性多肽可以是MUC1的同种型或其亚基或片段。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与免疫原性多肽具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括SEQ.ID.NO.:5的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括由SEQ.ID.NO.:6确定的以下序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括由SEQ.ID.NO.:9确定的以下序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括与SEQ.ID.NO.:5、SEQ.ID.NO.:6、SEQ.ID.NO.:9具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的序列或通过备选密码子替换从SEQ.ID.NO.:5、SEQ.ID.NO.:6、SEQ.ID.NO.:9生成的序列。在一些实施方案中,与野生型人MUC1序列相比,由本文所述腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单个氨基酸置换或缺失。

[0249] Brachyury抗原靶标

[0250] 本公开内容还提供了包括针对Brachyury的一种或多种抗原的免疫治疗。Brachyury(在人类中也称为“T”蛋白)是在早期发育期间,主要在正常中胚层的形成和分化中发挥关键性作用的转录因子T-盒家族的成员,其特征在于被指定为T结构域的高度保守的DNA结合结构域。上皮-间质转化(EMT)是原发性肿瘤进展成转移性状态期间的关键步骤,在该步骤中,Brachyury发挥至关重要的作用。人类癌细胞中Brachyury的表达诱导EMT的变化特征,包括间质标志物的上调、上皮标志物的下调以及细胞迁移和侵袭的增加。相反,对Brachyury的抑制导致间质标志物的下调以及细胞迁移和侵袭的减少,并削弱了人类肿瘤细胞形成转移瘤的能力。Brachyury可用来介导上皮-间质转化并促进侵袭。

[0251] 本公开内容还提供了调节Brachyury对细胞增殖疾病如癌症中的上皮-间质转化功能的影响的免疫治疗。本公开内容还提供了调节Brachyury促进在细胞增殖疾病如癌症中的侵袭的能力的免疫治疗。本公开内容还提供了调节Brachyury的T盒结构域的DNA结合功能的免疫治疗。在一些实施方案中,Brachyury免疫治疗可进一步包括针对CEA或MUC1、MUC1c或MUC1n的一种或多种抗原。

[0252] Brachyury表达在大多数正常人类组织中几乎不可检测,并且高度受限于人类肿瘤且经常过表达,从而使其成为对于免疫治疗有吸引力的靶抗原。在人类中,Brachyury由T基因编码(GenBank:AJ001699.1,NCBI:NM_003181.3)。存在通过在人类中发现的替代剪接产生的至少两种不同的同种型。每种同种型都具有许多天然变体。

[0253] Brachyury是免疫原性的,并且在体外扩增的Brachyury特异性CD8⁺T细胞可使表达Brachyury的肿瘤细胞裂解。Brachyury的这些特征使其成为对于免疫治疗有吸引力的TAA。Brachyury蛋白是一种T盒转录因子。它可通过其N末端中被称为T盒的区域与特定的DNA元件,即邻近的回文序列“TCACACCT”结合,以在与这样的位点结合时激活基因转录。

[0254] 本公开内容还提供了包含Brachyury、CEA或其组合的疫苗。在一些实施方案中,抗原组合包含在如本文所提供的一种载体中。在一些实施方案中,抗原组合包含在如本文所提供的单独的载体中。

[0255] 在具体的实施方案中,本发明涉及包含编码免疫原性多肽的序列的血清型5的复制缺陷型腺病毒载体。免疫原性多肽可以是Brachyury的同种型或其亚基或片段。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与免疫原性多肽具有至少70%、75%、80%、

85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括由SEQ.ID.NO.:7确定的以下序列。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体包含编码与免疫原性多肽具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的多肽的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括SEQ.ID.NO.:8的序列。在一些实施方案中,编码免疫原性多肽的序列包括与SEQ.ID.NO:7、SEQ.ID.NO:8具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性的序列或通过备选密码子替换从SEQ.ID.NO:7、SEQ.ID.NO:8生成的序列。在一些实施方案中,与野生型人Brachyury序列相比,由本文所述腺病毒载体编码的免疫原性多肽包含最多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40个或更多个点突变,如单个氨基酸置换或缺失。

[0256] 感染性疾病相关抗原靶标

[0257] 本公开内容的靶抗原包括但不限于衍生自各种感染原如寄生虫、细菌、病毒、朊病毒等中的任一种的抗原。感染原可指能够感染宿主的任何活生物体。感染原包括,例如,细菌,任何种类的病毒如单链RNA病毒、单链DNA病毒,真菌,寄生虫和原生动物。

[0258] 可与本公开内容的组合物和方法一起使用的感染性疾病相关靶抗原的实例可衍生自以下物种:放线杆菌属的种(*Actinobacillus* spp.)、放线菌属的种(*Actinomyces* spp.)、腺病毒(1、2、3、4、5和7型)、腺病毒(40和41型)、气球菌属的种(*Aerococcus* spp.)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)、管圆线虫(*Angiostrongylus cantonensis*)、似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*)、蛔虫属的种(*Ascaris* spp.)、曲霉属的种(*Aspergillus* spp.)、巴倍虫属的种(*Babesia* spp.)、巴贝西虫(*B.microti*)、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、拟杆菌属的种(*Bacteroides* spp.)、结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*)、杆状巴尔通氏体(*Bartonella bacilliformis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、蓝舌病病毒(*Bluetongue virus*)、支气管炎博德特氏菌(*Bordetella bronchiseptica*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、阿氏疏螺旋体(*Borrelia afzelii*)、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嘎氏疏螺旋体(*Borrelia garinii*)、粘膜炎布兰汉氏球菌(*Branhamella catarrhalis*)、布鲁氏菌属的种(*Brucella* spp.) (流产布鲁氏菌(*B.abortus*)、狗布鲁氏菌(*B.canis*)、马尔他布鲁氏菌(*B.melitensis*)、猪布鲁氏菌(*B.suis*))、布鲁格丝虫属的种(*Brugia* spp.)、鼻疽伯克霍尔德氏菌(鼻疽假单胞菌, *Burkholderia*, (*Pseudomonas mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(类鼻疽假单胞菌, *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei*)、加利福尼亚血清组(California serogroup)、胚胎弯曲杆菌胎儿亚种(*Campylobacter fetus* subsp.*Fetus*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、大肠弯曲杆菌(*C.coli*)、胚胎弯曲杆菌空肠亚种(*C.fetus* subsp.*Jejuni*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga* spp.)、基孔肯雅病毒(*Chikungunya virus*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)、华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、梭菌属的种(*Clostridium* spp.) (除了上文所列物种)、粗球孢子菌

(*Coccidioides immitis*)、科罗拉多蜱传热病毒 (Colorado tick fever virus)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、伯纳特氏立克次氏体 (*Coxiella burnetii*)、柯萨奇病毒 (Coxsackievirus)、克雅氏病病原体 (Creutzfeldt-Jakob agent)、库鲁病因子 (Kuru agent)、克里米亚-刚果出血热病毒 (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*)、巨细胞病毒、圆孢子球虫 (*Cyclospora cayatanesis*)、登革病毒 (1、2、3、4型) (Dengue virus (1,2,3,4))、类白喉菌 (*Diphtheroids*)、东部 (西部) 马脑炎病毒 (Eastern (Western) equine encephalitis virus)、埃博拉病毒 (Ebola virus)、细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*)、埃可病毒 (Echovirus)、迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、肠杆菌属 (*Enterobacter* spp.)、肠病毒70 (Enterovirus 70)、絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*)、埃立克体属的种 (*Ehrlichia* spp)、腺热埃立克体 (*Ehrlichia sennetsu*)、小孢子菌属的种 (*Microsporum* spp.)、毛癣菌属的种 (*Trichophyton* spp.)、爱泼斯坦-巴尔病毒、肠道出血性大肠杆菌 (*Escherichia coli*, enterohemorrhagic)、肠侵入性大肠杆菌 (*Escherichia coli*, enteroinvasive)、肠道致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli*, enteropathogenic)、产肠毒素大肠杆菌 (*Escherichia coli*, enterotoxigenic)、肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*)、土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*)、梭杆菌属的种 (*Fusobacterium* spp.)、溶血孪生球菌 (*Gemella haemolysans*)、篮氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*)、瓜纳瑞托病毒 (Guanarito virus)、杜氏嗜血菌 (*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血菌b组 (*Haemophilus influenzae* (group b))、汉坦病毒 (Hantavirus)、甲型肝炎病毒 (Hepatitis A virus)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒 (Hepatitis D virus)、戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus)、单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus)、疱疹病毒 (*Herpesvirus simiae*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、人冠状病毒 (Human coronavirus)、人免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、人轮状病毒 (Human rotavirus)、人类T淋巴细胞病毒 (Human T-lymphotrophic virus)、流感病毒 (Influenza virus) (包括 H5N1)、呼宁病毒 (Junin virus)/马秋博病毒 (Machupo virus)、克雷伯氏菌属的种 (*Klebsiella* spp.)、库阿撒鲁尔森林病病毒 (Kyasanur Forest disease virus)、乳杆菌属的种 (*Lactobacillus* spp.)、拉沙病毒 (Lassa virus)、侵肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*)、婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*)、利什曼原虫属的种 (*Leishmania* spp.)、问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (Lymphocytic choriomeningitis virus)、马秋博病毒 (Machupo virus)、马尔堡病毒 (Marburg virus)、麻疹病毒 (Measles virus)、微球菌属的种 (*Micrococcus* spp.)、莫拉氏菌属的种 (*Moraxella* spp.)、分枝杆菌属的种 (*Mycobacterium* spp.) (除了牛分支杆菌 (*M. bovis*)、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分支杆菌、人型支原体 (*Mycoplasma hominis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、唾液支原体 (*M. salivarium*)、发酵支原体 (*M. fermentans*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、福氏耐格里变形虫 (*Naegleria fowleri*)、美洲板口线虫 (*Necator americanus*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria*

gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitides*)、奈瑟氏球菌属的种(*Neisseria* spp.) (除了淋病奈瑟氏球菌和脑膜炎奈瑟氏球菌)、诺卡氏菌属的种(*Nocardia* spp.)、诺沃克病毒(Norwalk virus)、鄂木斯克出血热病毒(Omsk hemorrhagic fever virus)、旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、后睾吸虫属的种(*Opisthorchis* spp.)、细小病毒B19(Parvovirus B19)、巴斯德氏菌属的种(*Pasteurella* spp.)、消化球菌属的种(*Peptococcus* spp.)、消化链球菌属的种(*Peptostreptococcus* spp.)、镰状疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、疟原虫属的种(*Plasmodium* spp.)、类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)、波瓦生脑炎病毒(Powassan encephalitis virus)、变形菌属的种(*Proteus* spp.)、假单胞菌属的种(*Pseudomonas* spp.) (除了鼻疽假单胞菌(*P.mallei*)、类鼻疽假单胞菌(*P.pseudomallei*))、狂犬病病毒(Rabies virus)、呼吸道合胞体病毒(Respiratory syncytial virus)、鼻病毒(Rhinovirus)、蜱立克次氏体(*Rickettsia akari*)、普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*)、加拿大立克次氏体(*R.Canada*)、立氏立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*)、里夫特山谷病毒(Rift Valley virus)、罗斯河病毒(Ross river virus)/阿尼昂尼昂病毒(O' Nyong-Nyong virus)、风疹病毒(Rubella virus)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、沙门氏菌属的种(*Salmonella* spp.) (除了上文所列的种)、血吸虫属的种(*Schistosoma* spp.)、羊瘙痒症病原体(Scrapie agent)、沙雷氏菌属的种(*Serratia* spp.)、志贺氏菌属的种(*Shigella* spp.)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、申克氏孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)、圣路易斯脑炎病毒(St.Louis encephalitis virus)、摩菜河谷脑炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、牛带绦虫(*Taenia saginata*)、猪带绦虫(*Taenia solium*)、犬弓蛔虫(*Toxocara canis*)、猫弓蛔虫(*T.cati*)、锥虫弓蛔虫(*T.cruzi*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、旋毛虫属的种(*Trichinella* spp.)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、毛首鞭虫(*Trichuris trichiura*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*)、牛痘病毒(*Vaccinia virus*)、水痘带状疱疹病毒(*Varicella-zoster virus*)、东部马脑炎病毒(EEEV)、严重急性呼吸道病毒(severe acute respiratory virus,SARS)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus,VEEV)、水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus)、霍乱弧菌血清变型01(*Vibrio cholerae*, serovar 01)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、西尼罗病毒(West Nile virus)、班氏吴策线虫(*Wuchereria bancrofti*)、黄热病毒(Yellow fever virus)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)以及鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)。靶抗原可包括由任何感染性生物体产生的蛋白质或其变体或片段。

[0259] 许多病毒与病毒性出血热相关,包括线状病毒(例如,埃博拉病毒、马尔堡病毒和

雷斯顿病毒)、砂粒样病毒(例如,拉沙病毒、呼宁病毒和马秋博病毒)和布尼亚病毒。此外,已将静脉病毒,包括例如,里夫特山谷热病毒鉴定为病毒性出血热的病原体。出血热和相关炎症的病原体还可包括副粘病毒,特别是呼吸道合胞体病毒。此外,已将引起人类出血热的其他病毒鉴定为属于以下病毒组:披膜病毒(基孔肯雅病毒)、黄病毒(登革病毒、黄热病毒、库阿撒鲁尔森林病病毒、鄂木斯克出血热病毒)、内罗病毒(克里米亚-刚果出血热病毒)和汉坦病毒(肾病综合症出血热病毒、流行性肾病病毒)。此外,将辛诺柏病毒(*Sin Nombre virus*)鉴定为1993年美国西南部汉坦病毒肺综合征爆发的病原体。

[0260] 靶抗原可包括病毒外壳蛋白,即,流感神经氨酸酶和血凝素、HIV gp160或其衍生物、HIV Gag、HIV Nef、HIV Pol、SARS外壳蛋白、疱疹病毒体蛋白、WNV蛋白等。靶抗原还可包括细菌表面蛋白,包括肺炎球菌PsaA、PspA、LytA,细菌病原体的表面或毒性相关蛋白,如淋病奈瑟氏球菌(*Nisseria gonorrhoea*)、外膜蛋白或表面蛋白酶。

[0261] HPV抗原靶标

[0262] 靶抗原还可包括与人乳头瘤病毒(HPV)相关的蛋白质或其变体或片段,如癌蛋白E6和E7。在某些实施方案中,可对癌蛋白进行修饰以产生非致癌变体或相对于野生型蛋白具有降低的致癌性的变体。例如,可删除肽中负责结合肿瘤抑制蛋白(例如,p53和pRb)的部分或对该部分进行修饰,使得其不再与肿瘤抑制蛋白相互作用。作为另一个实例,作为激酶的癌蛋白如Her2/neu可例如通过点突变被激酶失活。在一些情况下,在免疫期间可使用两种或更多种靶抗原。例如,可在融合蛋白或含有编码经修饰或未经修饰的E6和E7靶抗原的异源核苷酸的单独载体中将E6和E7抗原组合。例如,Ad5-E6载体可与Ad5-E7载体一起施用。在该实例中,可同时施用或可依次施用Ad5-E6载体和Ad5-E7载体。

[0263] 高风险人乳头瘤病毒(HPV)如16型HPV与宫颈的病因和多于90%的HPV相关头颈鳞状细胞癌相关。预防性疫苗如人乳头瘤病毒二价[16和18型]疫苗以及重组人乳头瘤病毒四价[6、11、16和18型]疫苗可通过防止病毒感染而成为对抗HPV相关癌症的主要防御措施,但报道指出它们对已建立疾病的主动免疫治疗无效。HPV早期6(E6)和早期7(E7)基因在HPV诱导的癌症中以高水平表达,并且参与原代人表皮细胞的永生。因此,这些病毒抗原是肿瘤特异性免疫治疗的理想靶标,因为这些病毒抗原与许多其他肿瘤相关抗原不同,它们是“非自身的”,因此不具有诱导自身免疫的潜力。

[0264] 本文公开了使用与程序性死亡配体1(PD1)阻断相组合以免疫HPV16基因E6和E7(Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7)的病毒基因递送平台的针对人乳头瘤病毒(HPV)的免疫治疗。本文还公开了由携带HPV16型E6和E7的经修饰的基因的基因递送媒介物(Ad5[E1-,E2b-])组成的免疫治疗剂。可对HPV E6和E7基因进行修饰以使其不致癌同时保留对于产生针对HPV诱导的肿瘤的免疫应答所必需的抗原性。经修饰的基因可缺乏降解p53、pRb和PTPN13的能力。经修饰的基因可并入到疫苗(Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7)中。Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7疫苗可保留诱导HPV特异性细胞介导的免疫(CMI)应答的能力,并且可与标准临床治疗协同作用,从而增强免疫介导的表达HPV-E6/E7的肿瘤的清除。

[0265] 激活与抑制信号之间的平衡调控T淋巴细胞与肿瘤细胞之间的相互作用,其中通过T细胞受体(TCR)的抗原识别来启动T细胞应答。在一些情况下,与仅接受化疗/放疗的受试者相比,当与具有表达HPV-E6/E7的肿瘤的小鼠中的化疗/放疗组合时,用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行免疫治疗可导致显著的总存活期改善。

[0266] 个性化肿瘤相关抗原

[0267] 在某些实施方案中,可直接从患有增殖性疾病或癌症的个体鉴定与本发明的组合物和方法一起使用的肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,癌症可包括良性肿瘤、转移性肿瘤、癌或肉瘤等。在一些实施方案中,个性化肿瘤抗原可包括患者的MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA,并且作为整体、部分或作为变体进一步用作靶抗原。

[0268] 在这方面,可使用多种已知的技术进行筛选,以从个体鉴定肿瘤靶抗原。例如,在一个实施方案中,从患者取出肿瘤活检物,从肿瘤细胞分离RNA并使用基因芯片(例如,来自Affymetrix, Santa Clara, Calif.)进行筛选,并鉴定肿瘤抗原。一旦肿瘤靶抗原得以鉴定,则随后可使用本领域已知的技术对其进行克隆、表达和纯化。

[0269] 该靶抗原随后可与一个或多个表位连接,或者并入或连接到本文所述的盒或病毒载体并施用于患者,以便改变对从肿瘤分离的靶分子的免疫应答。以这种方式,在本发明的上下文中考虑了“个性化”免疫治疗和疫苗。当癌症是遗传性的(即经遗传获得),例如患者已被鉴定出具有BRAC1或BRAC2突变时,则可预防性地使用该疫苗。当癌症是散发性的时,可使用免疫治疗以在受试者中减小肿瘤的大小、增强整体机能并减少癌症的复发。

[0270] 联合免疫治疗和疫苗

[0271] 本公开内容提供了用于治疗癌症和感染性疾病的联合免疫治疗和疫苗组合物。在一些方面,本文提供的联合免疫治疗和疫苗可包括针对与癌症发展相关的抗原如肿瘤相关抗原(TAA)或已知涉及特定感染性疾病的抗原如感染性疾病相关抗原(IDAA)的多靶向免疫治疗方法。在一些方面,本文提供的联合免疫治疗和疫苗可包括针对与癌症或感染性疾病发展相关的抗原的多靶向抗原标签免疫治疗方法。在各个实施方案中,本发明的组合物和方法提供了基于病毒的载体,该载体表达如本文所提供的用于疾病免疫的MUC1、MUC1c、MUC1n、T和/或CEA的变体。这些载体可产生对MUC1、MUC1c、MUC1n、T和/或CEA的免疫应答。

[0272] 在一些方面,载体包含至少一种抗原。在一些方面,载体包含至少两种抗原。在一些方面,载体包含至少三种抗原。在一些方面,载体包含多于三种抗原。在一些方面,疫苗制剂包括1:1比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:2比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:3比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:4比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:5比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:6比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:7比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:8比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:9比例的载体与抗原。在一些方面,疫苗包括1:10比例的载体与抗原。

[0273] 在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少两种各自含有至少一种抗原的载体。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少三种各自含有至少一种抗原靶标的载体。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含多于三种各自含有至少一种抗原的载体。

[0274] 在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少两种载体,其中该至少两种载体的第一载体包含至少一种抗原,并且其中该至少两种载体的第二载体包含至少两种抗原。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含至少三种载体,其中该至少三种载体的第一载体包含至少一种抗原,并且其中该至少三种载体的第二载体包含至少两种抗原。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含三种或更多种载体,其中该三种或更多种载体的第一载体包含至少一种抗原,并且其中该三种或更多种载体的第二载体包含至少两种抗

原。在一些方面,疫苗为组合疫苗,其中该疫苗包含多于三种各自含有至少两种抗原的载体。

[0275] 当不同抗原的混合物被同时施用或从个体中的相同或不同载体同时表达时,它们可能彼此竞争。因此,必须对联合免疫治疗或疫苗中包含不同浓度和比例的表达抗原的制剂进行评估并对其进行调整以适于个体或个体群组,从而确保施用后有效且持续的免疫应答。

[0276] 包含多种抗原的组合物可以以各种比例存在。例如,具有多于一种载体的制剂可具有各种比例。例如,免疫治疗或疫苗可具有化学计量比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:30、2:1、2:3、2:4、2:5、2:6、2:7、2:8、3:1、3:3、3:4、3:5、3:6、3:7、3:8、3:1、3:3、3:4、3:5、3:6、3:7、3:8、4:1、4:3、4:5、4:6、4:7、4:8、5:1、5:3、5:4、5:6、5:7、5:8、6:1、6:3、6:4、6:5、6:7、6:8、7:1、7:3、7:4、7:5、7:6、7:8、8:1、8:3、8:4、8:5、8:6或8:7的两种不同的载体。例如,免疫治疗或疫苗可具有以下化学计量比的三种不同的载体:1:1:1、1:2:1、1:3:1、1:4:1、1:5:1、1:6:1、1:7:1、1:8:1、2:1:1、2:3:1、2:4:1、2:5:1、2:6:1、2:7:1、2:8:1、3:1、3:3:1、3:4:1、3:5:1、3:6:1、3:7:1、3:8:1、3:1:1、3:3:1、3:4:1、3:5:1、3:6:1、3:7:1、3:8:1、4:1:1、4:3:1、4:4:1、4:5:1、4:6:1、4:7:1、4:8:1、5:1:1、5:3:1、5:4:1、5:5:1、5:6:1、5:7:1、5:8:1、6:1:1、6:3:1、6:4:1、6:5:1、6:6:1、6:7:1、6:8:1、7:1:1、7:3:1、7:4:1、7:5:1、7:6:1、7:7:1、7:8:1、8:1:1、8:3:1、8:4:1、8:5:1、8:6:1、8:7:1、8:8:1、1:1:2、1:2:2、1:3:2、1:4:2、1:5:2、1:6:2、1:7:2、1:8:2、2:1:2、2:3:2、2:4:2、2:5:2、2:6:2、2:7:2、2:8:2、3:1:2、3:3:2、3:4:2、3:5:2、3:6:2、3:7:2、3:8:2、3:1:2、3:3:2、3:4:2、3:5:2、3:6:2、3:7:2、3:8:2、4:1:2、4:3:2、4:4:2、4:5:2、4:6:2、4:7:2、4:8:2、5:1:2、5:3:2、5:4:2、5:5:2、5:6:2、5:7:2、5:8:2、6:1:2、6:3:2、6:4:2、6:5:2、6:6:2、6:7:2、6:8:2、7:1:2、7:3:2、7:4:2、7:5:2、7:6:2、7:7:2、7:8:2、8:1:2、8:3:2、8:4:2、8:5:2、8:6:2、8:7:2、8:8:2、1:1:3、1:2:3、1:3:3、1:4:3、1:5:3、1:6:3、1:7:3、1:8:3、2:1:3、2:3:3、2:4:3、2:5:3、2:6:3、2:7:3、2:8:3、3:1:3、3:3:3、3:4:3、3:5:3、3:6:3、3:7:3、3:8:3、3:1:3、3:3:3、3:4:3、3:5:3、3:6:3、3:7:3、3:8:3、4:1:3、4:3:3、4:4:3、4:5:3、4:6:3、4:7:3、4:8:3、5:1:3、5:3:3、5:4:3、5:5:3、5:6:3、5:7:3、5:8:3、6:1:3、6:3:3、6:4:3、6:5:3、6:6:3、6:7:3、6:8:3、7:1:3、7:3:3、7:4:3、7:5:3、7:6:3、7:7:3、7:8:3、8:1:3、8:3:3、8:4:3、8:5:3、8:6:3、8:7:3、8:8:3、1:1:4、1:2:4、1:3:4、1:4:4、1:5:4、1:6:4、1:7:4、1:8:4、2:1:4、2:3:4、2:4:4、2:5:4、2:6:4、2:7:4、2:8:4、3:1:4、3:3:4、3:4:4、3:5:4、3:6:4、3:7:4、3:8:4、3:1:4、3:3:4、3:4:4、3:5:4、3:6:4、3:7:4、3:8:4、4:1:4、4:3:4、4:4:4、4:5:4、4:6:4、4:7:4、4:8:4、5:1:4、5:3:4、5:4:4、5:5:4、5:6:4、5:7:4、5:8:4、6:1:4、6:3:4、6:4:4、6:5:4、6:6:4、6:7:4、6:8:4、7:1:4、7:3:4、7:4:4、7:5:4、7:6:4、7:7:4、7:8:4、8:1:4、8:3:4、8:4:3、8:5:4、8:6:4、8:7:4、8:8:4、1:1:5、1:2:5、1:3:5、1:4:5、1:5:5、1:6:5、1:7:5、1:8:5、2:1:5、2:3:5、2:4:5、2:5:5、2:6:5、2:7:5、2:8:5、3:1:5、3:3:5、3:4:5、3:5:5、3:6:5、3:7:5、3:8:5、3:1:5、3:3:5、3:4:5、3:5:5、3:6:5、3:7:5、3:8:5、4:1:5、4:3:5、4:4:5、4:5:5、4:6:5、4:7:5、4:8:5、5:1:5、5:3:5、5:4:5、5:5:5、5:6:5、5:7:5、5:8:5、6:1:5、6:3:5、6:4:5、6:5:5、6:6:5、6:7:5、6:8:5、7:1:5、7:3:5、7:4:5、7:5:5、7:6:5、7:7:5、7:8:5、8:1:5、8:3:5、8:4:5、8:5:5、8:6:5、8:7:5、8:8:5、1:1:6、1:2:6、1:3:6、1:4:6、1:5:6、1:6:6、1:7:6、1:8:6、2:1:6、2:3:6、2:4:6、2:5:6、2:6:6、2:7:6、2:8:6、3:1:6、3:3:6、3:4:6、3:5:6、3:6:6、3:7:6、3:8:6、

3:1:6、3:3:6、3:4:6、3:5:6、3:6:6、3:7:6、3:8:6、4:1:6、4:3:6、4:4:6、4:5:6、4:6:6、4:7:6、4:8:6、5:1:6、5:3:6、5:4:6、5:5:6、5:6:6、5:7:6、5:8:6、6:1:6、6:3:6、6:4:6、6:5:6、6:6:6、6:7:6、6:8:6、7:1:6、7:3:6、7:4:6、7:5:6、7:6:6、7:7:6、7:8:6、8:1:6、8:3:6、8:4:6、8:5:6、8:6:5、8:7:6、8:8:6、1:1:7、1:2:7、1:3:7、1:4:7、1:5:7、1:6:7、1:7:7、1:8:7、2:1:7、2:3:7、2:4:7、2:5:7、2:6:7、2:7:7、2:8:7、3:1:7、3:3:7、3:4:7、3:5:7、3:6:7、3:7:7、3:8:7、3:1:7、3:3:7、3:4:7、3:5:7、3:6:7、3:7:7、3:8:7、4:1:7、4:3:7、4:4:7、4:5:7、4:6:7、4:7:7、4:8:7、5:1:7、5:3:7、5:4:7、5:5:7、5:6:7、5:7:7、5:8:7、6:1:7、6:3:7、6:4:7、6:5:7、6:6:7、6:7:7、6:8:7、7:1:7、7:3:7、7:4:7、7:5:7、7:6:7、7:7:7、7:8:7、8:1:7、8:3:7、8:4:7、8:5:7、8:6:5、8:7:7或8:8:7。

[0277] 在一些方面,本公开内容提供了包含针对TAA的多靶向免疫治疗的联合免疫治疗。在一些方面,本公开内容提供了包含针对IDAA的多靶向免疫治疗的联合免疫治疗。

[0278] 本公开内容提供了包括至少两种、至少三种或多于三种不同的靶抗原的联合免疫治疗或疫苗,该靶抗原包含编码修饰的CEA、MUC1c和/或Brachyury的序列。例如,联合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的靶抗原,该靶抗原包含编码修饰的CEA、MUC1c和/或Brachyury的序列,其中该修饰的CEA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性值的序列;其中该修饰的MUC1c包含与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性值的序列;并且其中该修饰的Brachyury包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%、99.5%、99.9%的同一性值的序列。在一些实施方案中,修饰的CEA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%的同一性值的序列,并在610位具有Asn→Asp置换。

[0279] 在一些方面,本公开内容提供了包括针对TAA的多靶向免疫治疗和分子组合物的联合免疫治疗,该分子组合物包含靶向免疫抑制途径的至少一种免疫检查点蛋白的免疫途径检查点调节剂。在一些方面,本公开内容提供了包括针对IDAA的多靶向免疫治疗和分子组合物的联合免疫治疗,该分子组合物包含靶向免疫抑制途径的至少一种免疫检查点蛋白的免疫途径检查点调节剂。本公开内容提供了联合免疫治疗或疫苗,其包括:至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码修饰的CEA、MUC1c和/或Brachyury的序列的靶抗原和至少一种包含免疫途径检查点调节剂的分子组合物。例如,联合免疫治疗或疫苗可包括至少两种、至少三种或多于三种不同的包含编码修饰的CEA、MUC1c和/或Brachyury的序列的靶抗原和至少一种包含免疫途径检查点调节剂的分子组合物,其中该修饰的CEA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性值的序列;其中该修饰的MUC1c包含与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的同一性值的序列;其中该修饰的Brachyury包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%、99.5%、99.9%的同一性值的序列。在一些实施方案中,修饰的CEA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%、99.9%或100%的同一性值的序列,并在610位具有Asn→Asp置换。

[0280] 在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂靶向CTLA4。在一些实施方案中,免疫

途径检查点调节剂靶向PD1。在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂靶向PDL1。在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂靶向LAG3。在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂靶向B7-H3。在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂靶向B7-H4。在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂靶向TIM3。在一些实施方案中,免疫途径检查点调节剂是针对PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RPI、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、KIR、TCR、LAG3、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3 (即, HAVcr2)、GAL9和A2aR的单克隆或多克隆抗体。

[0281] 在一些实施方案中,重组核酸载体中的至少一种是复制缺陷型腺病毒载体,该复制缺陷型腺病毒载体包括含有第一同一性值的复制缺陷型5型腺病毒载体。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体在E2b区包含缺失。在一些实施方案中,复制缺陷型腺病毒载体进一步在E1区包含缺失。在一些实施方案中,第一同一性值为至少90%。

[0282] 在一些实施方案中,第一同一性值为至少95%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少99%。在一些实施方案中,第一同一性值为100%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少90%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少95%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少99%。在一些实施方案中,第一同一性值为100%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少90%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少95%。在一些实施方案中,第一同一性值为至少99%。在一些实施方案中,第一同一性值为100%。

[0283] 在一些实施方案中,重组核酸载体中的至少一种包含与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性的序列。在一些实施方案中,重组核酸载体包含与SEQ ID NO:3中的区域具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性的区域,其中该区域选自26048-26177、26063-26141、1-103、54-103、32214-32315和32214-32262。在一些实施方案中,重组核酸载体进一步包含编码与由SEQ ID NO:3中1057位与3165位之间的区域编码的肽具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性的肽的区域。

[0284] 免疫融合配偶体抗原靶标

[0285] 本发明的病毒载体还可包括编码增强靶抗原的免疫原性的蛋白质的核酸序列。在这方面,用含有这样的蛋白质的病毒载体免疫后产生的蛋白质可以是融合蛋白,该融合蛋白包含与增强感兴趣的靶抗原的免疫原性的蛋白质融合的感兴趣的靶抗原。

[0286] 在一个实施方案中,这样的免疫融合配偶体衍生自分枝杆菌属,如结核分枝杆菌衍生的Ra12片段。用于增强异源多核苷酸/多肽序列的表达和/或免疫原性的Ra12组合物和方法描述于美国专利申请60/158,585和美国专利号7,009,042中,这些申请通过引用而整体并入本文。简言之,Ra12是指为结核分枝杆菌MTB32A核酸的子序列的多核苷酸区域。MTB32A是由结核分枝杆菌的有毒和无毒菌株中的基因编码的32kDa的丝氨酸蛋白酶。已经对MTB32A的核苷酸序列和氨基酸序列进行了描述(参见例如,美国专利申请60/158,585; Skeiky等人, *Infection and Immun.* 67:3998-4007 (1999), 该文献通过引用而整体并入本文)。MTB32A编码序列的C末端片段以高水平表达并在整个纯化过程中保持为可溶的多肽。此外,Ra12可增强与其融合的异源免疫原性多肽的免疫原性。一个Ra12融合多肽包含对应于MTB32A的氨基酸残基192至323的14kDa C末端片段。其他Ra12多核苷酸通常包含编码Ra12多肽的一部分的至少约15、30、60、100、200、300个或更多个核苷酸。Ra12多核苷酸可包

含天然序列(即,编码Ra12多肽或其一部分的内源序列),或者可包含这样的序列的变体。Ra12多核苷酸变体可包含一个或多个置换、添加、缺失和/或插入,使得所编码的融合多肽的生物活性相对于包含天然Ra12多肽的融合多肽基本上不降低。变体可与编码天然Ra12多肽或其一部分的多核苷酸序列具有至少约70%、80%或90%的同一性或更高的同一性。

[0287] 免疫融合配偶体可衍生自蛋白D,即革兰氏阴性细菌流感嗜血菌B的表面蛋白。在一些情况下,蛋白D衍生物包含大约前三分之一的蛋白质(例如,N末端前100-110个氨基酸)。蛋白D衍生物可被脂化。在某些实施方案内,脂蛋白D融合配偶体的前109个残基包含在N末端上,以向多肽提供额外的外源T细胞表位,这些残基可增加大肠杆菌中的表达水平并且可用作表达增强子。脂质尾部可确保抗原向抗原呈递细胞的最佳呈递。其他融合配偶体包括来自流感病毒NS1的非结构蛋白(血凝素)。通常,使用N末端的81个氨基酸,但可以使用包含T辅助表位的不同的片段。

[0288] 免疫融合配偶体可以是称为LYTA的蛋白质或其一部分(优选C末端部分)。LYTA衍生自肺炎链球菌,其合成称为酰胺酶LYTA的N-乙酰基-L-丙氨酸酰胺酶(由LytA基因编码)。LYTA是特异性降解肽聚糖骨架中某些键的自溶素。LYTA蛋白的C末端结构域负责对胆碱或一些胆碱类似物如DEAE的亲和力。已利用该性质来开发用于表达融合蛋白的大肠杆菌C-LYTA表达质粒。可使用在氨基末端含有C-LYTA片段的杂交蛋白的纯化。在另一个实施方案内,LYTA的重复部分可并入到融合多肽中。例如,可在残基178处开始的C末端区域中找到重复部分。一个特定的重复部分合并残基188-305。

[0289] 在一些实施方案中,抗原靶标包含含有细胞因子的免疫原性组分,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。在一些实施方案中,抗原靶标进一步包含含有细胞因子的一种或多种免疫原性组分,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。在一些实施方案中,抗原靶标包含免疫原性组分,该免疫原性组分包含编码IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13的核酸,与IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13具有基本的同一性的蛋白质,以及编码与IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13具有基本的同一性的蛋白质的核酸。

[0290] 在一些实施方案中,抗原靶标与包含细胞因子的免疫原性组分融合或连接,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。在一些实施方案中,抗原靶标在细胞中与包含细胞因子的免疫原性组分一起共表达,该细胞因子选自IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和IL-13。

[0291] 免疫途径检查点调节剂

[0292] 在一些实施方案中,本发明的组合物与一种或多种免疫检查点调节剂一起施用。激活与抑制信号之间的平衡调控T淋巴细胞与病变细胞之间的相互作用,其中通过T细胞受体(TCR)的抗原识别来启动T细胞应答。将抑制途径和信号称为免疫检查点。在正常情况下,免疫检查点在控制和防止自身免疫方面发挥关键作用,并且也保护免受响应于病原性感染而产生的组织损伤。

[0293] 本公开内容提供了用于治疗癌症和感染性疾病的联合免疫治疗,该联合免疫治疗

包括基于病毒载体的疫苗和用于调节免疫检查点抑制途径的组合物。在一些实施方案中,调节是增加基因或蛋白质的表达或活性。在一些实施方案中,调节是降低基因或蛋白质的表达或活性。在一些实施方案中,调节影响基因或蛋白质家族。

[0294] 通常,免疫抑制途径由配体-受体相互作用所启动。目前清楚的是,在疾病中,该疾病可指定免疫检查点途径作为诱导受试者的免疫抗性的机制。

[0295] 可通过已知调节一种或多种免疫抑制途径的分子组合物如siRNA、反义、小分子、模拟物、重组形式的配体、受体或蛋白质,或抗体(其可以是Ig融合蛋白)来阻断通过给定疾病诱导的受试者的免疫抗性或免疫抑制途径。例如,采用免疫检查点蛋白,如细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA4) 和程序性细胞死亡蛋白1 (PD1) 的阻断剂的初步临床发现已经显示出增强抗肿瘤免疫力的前景。

[0296] 因为病变细胞可表达多种抑制性配体,并且疾病浸润淋巴细胞表达多种抑制性受体,所以免疫检查点蛋白的双重或三重阻断可增强抗疾病免疫力。本文提供的联合免疫治疗可包括以下免疫检查点蛋白的一种或多种分子组合物:PD1、PDL1、PDL2、CD28、CD80、CD86、CTLA4、B7RP1、ICOS、B7RPI、B7-H3 (也称为CD276)、B7-H4 (也称为B7-S1、B7x和VCTN1)、BTLA (也称为CD272)、HVEM、KIR、TCR、LAG3 (也称为CD223)、CD137、CD137L、OX40、OX40L、CD27、CD70、CD40、CD40L、TIM3 (也称为HAVcr2)、GAL9和A2aR。在一些实施方案中,分子组合物包含siRNA。在一些实施方案中,分子组合物包含小分子。在一些实施方案中,分子组合物包含重组形式的配体。在一些实施方案中,分子组合物包含重组形式的受体。在一些实施方案中,分子组合物包含抗体。在一些实施方案中,联合治疗包括多于一种分子组合物和/或多于一种类型的分子组合物。如本领域技术人员将会理解的,未来发现的免疫检查点抑制途径的蛋白质也被设想为本公开内容所涵盖。

[0297] 在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节CTLA4的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节PD1的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节PDL1的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节LAG3的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节B7-H3的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节B7-H4的分子组合物。在一些实施方案中,联合免疫治疗包括用于调节TIM3的分子组合物。在一些实施方案中,调节是表达的增加或增强。在其他实施方案中,调节是表达的降低或缺失。

[0298] 两种示例性免疫检查点抑制剂包括细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡蛋白-1 (PD1)。CTLA-4只可在T细胞上表达,在T细胞中,CTLA-4调节T细胞活化的早期阶段。CTLA-4与共刺激性T细胞受体CD28相互作用,这可导致抑制T细胞活性的信号传导。一旦发生TCR抗原识别,CD28信号传导即可增强TCR信号传导,从而在一些情况下产生活化的T细胞,并且CTLA-4抑制CD28的信号传导活性。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症的与抗CTLA-4单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症的与CTLA-4分子组合物组合的如本文所提供的免疫治疗。

[0299] 程序性死亡细胞蛋白配体-1 (PDL1) 是B7家族的成员,并且分布在各种组织和细胞类型中。PDL1可与PD1相互作用,从而抑制T细胞活化以及CTL介导的裂解。已经在各种人类肿瘤中证实了PDL1的显著表达,并且PDL1表达是肿瘤逃避宿主抗肿瘤免疫应答的关键机制之一。程序性死亡配体1 (PDL1) 和程序性细胞死亡蛋白-1 (PD1) 作为免疫检查点相互作用。

这种相互作用可以是导致抗肿瘤免疫应答钝化和随后的肿瘤进展的主要耐受机制。PD1存在于活化的T细胞上,而PD1的主要配体PDL1往往在肿瘤细胞和抗原呈递细胞(APC)以及包括B细胞在内的其他细胞上表达。已经在包括HPV相关的头颈癌在内的各种人类肿瘤中证实了PDL1的显著表达。PDL1在T细胞上与PD1相互作用,从而抑制T细胞活化和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)介导的裂解。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症、与抗PD1或抗PDL1单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症、与PD1或抗PDL1分子组合物组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症、与抗CTLA-4以及抗PD1单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症、与抗CTLA-4以及PDL1单克隆抗体组合的如本文所提供的免疫治疗。本公开内容提供了用于治疗增殖性疾病和癌症、与抗CTLA-4、抗PD1、PDL1单克隆抗体或其组合相组合的如本文所提供的免疫治疗。

[0300] 本文提供了与可增加抗肿瘤效果的PD1阻断组合的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫。本发明人已经对由Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7疫苗诱导的CMI应答进行了表征,并示出了抗肿瘤应答的动力学,以评估治疗小与大的既定肿瘤的治疗潜力。

[0301] 免疫检查点分子可由T细胞表达。免疫检查点分子可有效地充当“制动器(brake)”来下调或抑制免疫应答。免疫检查点分子包括但不限于直接抑制免疫细胞的程序性死亡蛋白1(PD1,也称为PDCD1或CD279,登录号:NM_005018)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4,也称为CD152,GenBank登录号AF414120.1)、LAG3(也称为CD223,登录号:NM_002286.5)、Tim3(也称为HAVCR2,GenBank登录号:JX049979.1)、BTLA(也称为CD272,登录号:NM_181780.3)、BY55(也称为CD160,GenBank登录号:CR541888.1)、TIGIT(也称为IVSTM3,登录号:NM_173799)、LAIR1(也称为CD305,GenBank登录号:CR542051.1)、SIGLEC10(GeneBank登录号:AY358337.1)、2B4(也称为CD244,登录号:NM_001166664.1)、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、CD96、CRTAM、SIGLEC7、SIGLEC9、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、TGFBRII、TGFRBRI、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3。例如,PD1可与本发明的腺病毒疫苗组合以治疗有需要的患者。表1以未详尽列举的方式示出了可被灭活以改善本发明的腺病毒疫苗的效率的示例性免疫检查点基因。免疫检查点基因可选自表1中列出的这些基因以及涉及共抑制受体功能、细胞死亡、细胞因子信号传导、精氨酸色氨酸饥饿、TCR信号传导、诱导的T-reg抑制、控制转录因子的耗尽或无反应以及缺氧介导的耐受的其他基因。

[0302] 表1

[0303]

基因符号	NCBI # (GRCh38.p2)	开始	终止	基因组位置
ADORA2A	135	24423597	24442360	22q11.23
CD276	80381	73684281	73714518	15q23-q24
VTCN1	79679	117143587	117270368	1p13.1
BTLA	151888	112463966	112499702	3q13.2
CTLA4	1493	203867788	203873960	2q33
IDO1	3620	39913809	39928790	8p12-p11
KIR3DL1	3811	54816438	54830778	19q13.4
LAG3	3902	6772483	6778455	12p13.32
PDCD1	5133	241849881	241858908	2q37.3
HAVCR2	84868	157085832	157109237	5q33.3
VISTA	64115	71747556	71773580	10q22.1
CD244	51744	160830158	160862902	1q23.3
CISH	1154	50606454	50611831	3p21.3

[0304] 与单独的任一种药剂相比,基于腺病毒的疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可导致治疗的患者的癌症复发的减少。在本发明的又一个实施方案中,与单独的任一种药剂相比,基于腺病毒的疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可导致治疗的患者的转移瘤或微转移瘤存在或出现的减少。在另一个实施方案中,与单独的任一种药剂相比,基于腺病毒的疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可导致治疗的患者的改善的总存活期。在一些情况下,与单独的任一种药剂相比,腺病毒疫苗与免疫途径检查点调节剂的组合可增加患者中肿瘤特异性T细胞应答的频率或强度。

[0305] 本发明还公开了使用免疫检查点抑制来改善基于腺病毒载体的疫苗的性能。免疫检查点抑制可在疫苗接种时施用。免疫检查点抑制也可在疫苗后施用。免疫检查点抑制可与腺病毒疫苗施用同时发生。免疫检查点抑制可在疫苗接种后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50或60分钟发生。免疫检查点抑制也可在疫苗接种后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时发生。在一些情况下,免疫抑制可在疫苗接种后1、2、3、4、5、6或7天发生。免疫检查点抑制可在疫苗接种之前或之后任何时间发生。

[0306] 在另一个方面,本发明涉及包含抗原和免疫途径检查点调节剂的疫苗。本发明可涉及用于治疗具有将受益于受试者细胞上的免疫检查点(例如,PD1)及其天然结合配偶体下调的病况的受试者的方法。

[0307] 免疫途径检查点调节剂可与包含任何抗原的腺病毒疫苗组合。例如,抗原可以是MUC1c、HER3、Brachyury、HER2NEU、CEA或PSA。当与疫苗组合时,免疫途径检查点调节剂可产生协同效应。当与疫苗组合时,免疫途径检查点调节剂还可产生加性效应。

[0308] 制剂

[0309] 本发明提供了包含可通过任何途径单独或与药学上可接受的载体或赋形剂一起施用的疫苗接种方案的药物组合物,并且可以以单剂量和多剂量进行这样的施用。更具体

地,药物组合物可与片剂、胶囊、锭剂、糖锭、手糖(hand candy)、粉末、喷雾剂、水性悬浮剂、可注射溶液、酏剂、糖浆剂等形式的各种药学上可接受的惰性载体组合。这样的载体包括固体稀释剂或填充剂、无菌水性介质和各种无毒有机溶剂等。此外,可借助通常用于此类目的的各种类型的试剂将这样的口服药物制剂适当地变甜和/或调味。全文所述的组合物可配制成药物并用于治疗诊断患有疾病例如癌症的有需要的人或哺乳动物。

[0310] 为了施用,可将病毒载体原种与合适的缓冲液、生理学上可接受的载体、赋形剂等组合。在某些实施方案中,在合适的缓冲液,如无菌PBS或盐水中施用合适数目的病毒载体颗粒(VP)。在某些实施方案中,在特定的制剂中提供本文公开的病毒载体组合物用于皮下、肠胃外、静脉内、肌内或甚至腹膜内施用。在某些实施方案中,可在与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合的水中制备活性化合物作为游离碱或药理学上可接受的盐的溶液形式的制剂。还可在甘油、液体聚乙二醇、基于角鲨烯的乳液、基于角鲨烯的水包油乳液、油包水乳液、水包油乳液、非水性乳液、石蜡油包水乳液和其混合物以及在油中制备分散体。在其他实施方案中,可在用于通过吞咽或通过栓剂施用的药丸形式的特定的制剂中提供病毒载体。

[0311] 适用于可注射使用的说明性药物形式包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末(参见例如,美国专利号5,466,468)。达到容易注射程度的流体形式可能是优选的。在制造和储存条件下稳定的形式在本发明的范围内。在各个实施方案中,对各种形式进行保存以防止微生物如细菌、霉菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣如卵磷脂,通过在分散体的情况下维持所需的颗粒大小和/或通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞来促进对微生物作用的预防。可优选地包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0312] 在一个实施方案中,为了在水溶液中进行肠胃外施用,如果需要,可对该溶液进行适当缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等渗。这些特定的水溶液尤其适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这方面,根据本公开内容,可使用的无菌水性介质将是本领域技术人员已知的。例如,可将一个剂量溶解于1mL等渗NaCl溶液中,并加入到1000mL皮下灌注(hypodermoclysis)液体中或在推荐的输注部位进行注射(参见例如,“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第15版,第1035-1038和1570-1580页)。根据接受治疗的受试者的病况,可在剂量上发生一些变化。

[0313] 制剂的载体可包括任何及所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣材料、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮剂、胶体等。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗性组合物中。补充的活性成分也可并入到组合物中。

[0314] 在某些实施方案中,本发明的病毒载体可与一种或多种免疫刺激剂如佐剂联合施用。免疫刺激剂是指增强或加强对抗原的免疫应答(抗体和/或细胞介导的)的基本任何物质。一种类型的免疫刺激剂包括佐剂。许多佐剂含有被设计用于保护抗原免于快速分解代谢的物质,如氢氧化铝或矿物油,以及免疫应答的刺激物,如脂质A、百日咳博德特氏菌或结

核分枝杆菌衍生的蛋白质。某些佐剂可商购获得,例如,弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco 实验室);Merck佐剂65(Merck and Company, Inc.);AS-2(SmithKline Beecham);铝盐如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝;钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸的不溶性悬浮剂;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈;可生物降解的微球体;单磷酸脂质A和quil A。细胞因子如GM-CSF、IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和/或IL-13及其他细胞因子,如生长因子也可用作佐剂。

[0315] 在本发明的某些实施方案内,佐剂组合物可以是诱导主要为Th1型免疫应答的组合物。高水平的Th1型细胞因子(例如,IFN- γ 、TNF α 、IL-2和IL-12)倾向于有利于诱导对所施用抗原的细胞介导的免疫应答。相比之下,高水平的Th2型细胞因子(例如,IL-4、IL-5、IL-6和IL-10)倾向于有利于诱导体液免疫应答。在施用如本文所提供的疫苗之后,患者可支持包括Th1型和/或Th2型应答的免疫应答。在其中应答主要为Th1型的某些实施方案中,Th1型细胞因子的水平将比Th2型细胞因子的水平增加到更高的程度。可使用标准测定法容易地评估这些细胞因子的水平。因此,本发明的各个实施方案涉及使用细胞因子,例如与复制缺陷型病毒载体治疗同时提供的IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-8、IL-12、IL-18、IL-7、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10和/或IL-13增强对靶抗原,例如MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的免疫应答的治疗。在一些实施方案中,细胞因子或编码细胞因子的核酸与本文所述的复制缺陷型病毒一起施用。在一些实施方案中,在病毒载体施用之前或之后进行细胞因子施用。在一些实施方案中,能够增强对靶抗原,例如MUC1、MUC1c、MUC1n、T和/或CEA的免疫应答的复制缺陷型病毒载体进一步包含编码细胞因子的序列。

[0316] 用于引发主要为Th1型应答的某些说明性佐剂包括例如,单磷酸脂质A,如3-去-O-酰化单磷酸脂质A与铝盐的组合。**MPL**[®]佐剂可商购获得(参见例如,美国专利号4,436,727;4,877,611;4,866,034和4,912,094)。含CpG的寡核苷酸(其中CpG二核苷酸未甲基化)也诱导主要为Th1的应答(参见例如,WO 96/02555、WO 99/33488和美国专利号6,008,200和5,856,462)。还可使用免疫刺激性DNA序列。用于本发明的另一种佐剂包括皂苷,如Quil A或其衍生物,包括QS21和QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc.)、七叶皂苷;毛地黄皂苷;或者石头花属(Gypsophila)或奎奴亚藜(Chenopodium quinoa)皂苷。其他制剂可包括本发明的佐剂组合,例如包含QS21、QS7、Quil A、 β -七叶皂苷或毛地黄皂苷的下组中的至少两种的组合中的多于一种皂苷。

[0317] 在一些实施方案中,可通过鼻内喷雾剂、吸入剂和/或其他气雾剂递送媒介物来递送组合物。可采用使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰-甘油化合物的药物递送(参见例如,美国专利号5,725,871)。同样地,可采用聚四氟乙烯支持基质形式的说明性经粘膜药物递送(参见例如,美国专利号5,780,045)。

[0318] 脂质体、纳米胶囊、微粒、脂质颗粒、囊泡等可用于将本发明的组合物引入到合适的细胞/生物体中。可将本发明的组合物配制成包封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中进行递送。或者,本发明的组合物可与这样的载体媒介物的表面共价或非共价结合。脂质体可有效地用于将基因、各种药物、放射治疗剂、酶、病毒、转录因子、变构效应物等引入到多种培养的细胞系和动物中。此外,脂质体的使用似乎并不与全身递送后的自身免疫应答或不可接受的毒性相关联。在一些实施方案中,脂质体由分散在水性介质中的磷脂形成,并自发形成多层同心双层囊泡(即多层囊泡(MLV))。

[0319] 在一些实施方案中,本发明提供了本发明组合物的药学上可接受的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常可以以稳定且可再现的方式捕获化合物。为了避免由于细胞内聚合物超负荷而引起的副作用,可使用能够在体内降解的聚合物来设计这样的超细颗粒(大小约0.1 μm)。

[0320] 全文所述的组合物可包含化疗剂(例如,用于癌症治疗的化合物)或与该化疗剂一起施用。可与所公开的T细胞组合使用的癌症化疗剂包括但不限于有丝分裂抑制剂(长春花生物碱),如长春花新碱、长春花碱、长春地辛和NavelbineTM(长春瑞滨,5'-去甲脱水长春花碱);拓扑异构酶I抑制剂,如喜树碱化合物(例如,CamptosarTM(盐酸伊立替康)、HycamtinTM(盐酸拓扑替康)和衍生自喜树碱及其类似物的其他化合物);鬼臼毒素衍生物,如依托泊苷、替尼泊苷和米托鬼臼肼;烷化剂,如顺铂、环磷酰胺、氮芥、三亚甲基硫代磷酰胺、卡莫司汀、白消安、苯丁酸氮芥、belustine、乌拉莫司汀、chlomaphazin和达卡巴嗪;抗代谢物,如阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、巯基嘌呤、硫唑嘌呤和丙卡巴肼;抗生素,如多柔比星、博来霉素、放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、光神霉素、丝裂霉素、丝裂霉素C和道诺霉素;抗肿瘤抗体;达卡巴嗪;氮杂胞苷;安吡啶;美法仑;异环磷酰胺;和米托蒽醌。

[0321] 本文公开的组合物可与其他抗肿瘤剂,包括细胞毒性剂/抗肿瘤剂和抗血管生成剂联合施用。细胞毒性剂/抗肿瘤剂可定义为攻击并杀死癌细胞的药剂。一些细胞毒性剂/抗肿瘤剂可以是烷化剂,其使肿瘤细胞中的遗传物质烷基化,例如,顺铂、环磷酰胺、氮芥、三亚甲基硫代磷酰胺、卡莫司汀、白消安、苯丁酸氮芥、belustine、乌拉莫司汀、chlomaphazin和达卡巴嗪。其他细胞毒性剂/抗肿瘤剂可以是肿瘤细胞的抗代谢物,例如,阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、巯基嘌呤、硫唑嘌呤和丙卡巴肼。其他细胞毒性剂/抗肿瘤剂可以是抗生素,例如多柔比星、博来霉素、放线菌素D、柔红霉素、光神霉素、丝裂霉素、丝裂霉素C和道诺霉素。存在这些化合物的可商购的许多脂质体制剂。其他的细胞毒性剂/抗肿瘤剂可以是有丝分裂抑制剂(长春花生物碱)。这些抑制剂包括长春花新碱、长春花碱和依托泊苷。各种细胞毒性剂/抗肿瘤剂包括紫杉醇及其衍生物、L-天冬酰胺酶、抗肿瘤抗体、达卡巴嗪、氮胞苷、安吡啶、美法仑、VM-26、异环磷酰胺、米托蒽醌和长春地辛。

[0322] 还可使用抗血管生成剂。用于所公开的方法和组合物的合适的抗血管生成剂包括抗VEGF抗体,包括人源化和嵌合抗体、抗VEGF适体和反义寡核苷酸。其他的血管生成抑制剂包括血管抑素、内皮抑制素、干扰素、白介素1(包括 α 和 β)、白介素12、视黄酸和金属蛋白酶-1和-2(TIMP-1和TIMP-2)的组织抑制剂。还可使用小分子,包括拓扑异构酶如雷佐生、具有抗血管生成活性的拓扑异构酶II抑制剂。

[0323] 可与所公开的发明组合使用的其他抗癌剂包括但不限于:阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿可达佐;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美蒽醌;氨鲁米特;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;天冬酰胺酶;曲林菌素;安维汀;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苜替哌;比卡鲁胺;盐酸比生群;双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素C;卡鲁唑酮;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡米诺霉素;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克雷斯托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;放线菌素D;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吡啶;多西他赛;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌

啉;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;艾托卜宁;盐酸法屈唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷喹酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸依达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白介素II(包括重组白介素II或rIL2);干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -I a;干扰素 γ -I b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索蒽醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美伦孕酮;美法仑;美诺立尔;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啉;美妥替哌;米丁度胺;米托卡星(mitocarcin);米托孔星(mitocromin);米托洁林;丝裂马菌素;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;霉酚酸;诺考达唑;诺加霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗蒽醌;普卡霉素;普洛美坦;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑呋喃菌素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;斯帕磷酸钠;司帕霉素;盐酸螺旋锳;螺莫司汀;螺铂;链黑菌素;链脲霉素;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛蒽醌;替莫唑胺;替尼泊苷;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替哌;噻唑羧胺核苷;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西瑞宾;三甲曲沙;葡萄糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;乌拉莫司汀;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春花碱;硫酸长春花新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗新;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星。其他抗癌药包括但不限于:20-表-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;amidox;氨磷汀;氨基乙酰丙酸;氨柔比星;安吖啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗背侧化形态发生蛋白-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1);抗雄激素;前列腺癌;抗雌激素;抗瘤酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;无嘌呤酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;asulacrine;阿他美坦;阿莫司汀;axinastatin 1;axinastatin 2;axinastatin 3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮络氨酸;浆果赤霉素III衍生物;balanol;巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢扑酚;苯甲酰基星状孢菌素; β -内酰胺衍生物; β -alethine; β clamycin B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双吡丙啉基精胺;双奈法德;双曲群A(bistratene A);比折来新;breflate;溴匹立明;布朵替坦;丁硫氨酸亚砷亚胺;卡泊三醇;钙磷酸蛋白C;喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧胺三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍生抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗树精胺;天蚕抗菌肽B;西曲瑞克;二氢卞酚;氯喹啉磺酰胺;西卡前列素;顺式卞啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;collismycin A;collismycin B;康普瑞汀A4;康普瑞汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克雷斯托;念珠藻素8;念珠藻素A衍生物;curacin A;环戊蒽醌;环铂(cycloplatam);塞匹霉素;阿糖胞苷十八烷基磷酸钠;溶细胞因子;磷酸己烷雌酚(cytostatin);达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素B;德舍瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右丙亚胺;右维拉帕米;地吡啶;膜海鞘素B;didox;二乙基去甲精胺;二氢-5-氮杂胞苷;9-二氢泰素;二氧杂霉菌素(dioxamycin);二苯基螺莫司汀;多西他赛;廿二醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;度卡霉素SA;依布硒啉;

依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗(edrecolomab);依氟鸟氨酸;榄香烯;乙嘧替氟;表柔比星;爱普列特;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法曲唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度;氟卓斯汀;fluasterone;氟达拉滨;盐酸氟道诺霉素(fluorodaunorubicin hydrochloride);福酚美克;福美司坦;福司曲星;福莫司汀;德卞淋钆(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;调蛋白;六亚甲基双乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮;咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘代多柔比星;4-甘薯苦醇;伊罗普拉;伊索拉定;异邦格唑;异高软海绵素B;伊他司琼;加斯普拉诺利得(jasplakinolide);卡哈拉里德F(kahalalide F);三乙酸片螺素-N;兰瑞肽;雷那霉素;来格司亭;硫酸香菇多糖;雷波斯他汀;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+黄体酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide 7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索萘醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;lutetium texaphyrin;lysofylline;裂解肽;美坦辛;曼诺他汀A;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝抑蛋白;基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;美巴龙(merbarone);阿伏瑞林;蛋氨酸酶(methioninase);胃复安;MIF抑制剂;米非司酮;米替福星;米立司亭;错配的双链RNA;米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;迈托毒素成纤维细胞生长因子-皂草素;米托萘醌;莫法罗汀;莫拉司亭;人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体;单磷酸脂质A+分支杆菌细胞壁sk;莫哌达醇;多重耐药基因抑制剂;基于多肿瘤抑制基因1的治疗;芥子抗癌剂;印度洋海绵B(mycaperoxide B);分枝杆菌细胞壁提取物;myriaporone;N-乙酰地那林;N-取代苯甲酰胺;那法瑞林;nagrestip;纳洛酮+喷他佐辛;napavin;naphterpin;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性内肽酶;尼鲁米特;尼萨霉素;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;oxaunomycin;紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;palauamine;palmitoylrhizoxin;帕米膦酸;人参炔三醇;帕诺米芬;parabactin;泊泽尼普定;培门冬酶;培得星(peldesine);戊糖多硫酸钠;喷司他丁;喷曲唑;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏醇;吩嗪霉素(phenazinomycin);苯乙酸盐;磷酸酶抑制剂;溶链菌制剂(picibanil);盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;卟吩姆钠;紫菜霉素;强的松;丙基双吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白质A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂;微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;甲氧基吡唑啉吡啶;吡哆基化血红蛋白聚氧乙烯缀合物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化瑞替普汀;铈Re 186依替膦酸盐;根霉素;核糖酶;RII异维A酰胺;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;sarcophytol A;沙格司亭;Sdi1模拟物;司莫司汀;衰老衍生的抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;斯帕磷酸;穗霉素D(spicamycin D);螺莫司汀;斯耐潘定;海绵抑素1(spongistatin

1); 角鲨胺; 干细胞抑制剂; 干细胞分裂抑制剂; stipiamide; 溶基质蛋白酶抑制剂; sulfinosine; 强效血管活性肠肽拮抗剂; suradista; 苏拉明; 苦马豆素; 合成的糖胺聚糖; 他莫司汀; 它莫西芬甲碘化物; 牛磺莫司汀; 他扎罗汀; 替可加兰钠; 替加氟; tellurapyrylium; 端粒酶抑制剂; 替莫唑胺; 替莫唑胺; 替尼泊苷; 四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxide); tetrazomine; 菌体胚素(thaliblastine); 噻可拉林(thiocoraline); 血小板生成素; 血小板生成素模拟物; 胸腺法新; 胸腺生成素受体激动剂; 胸腺曲南; 促甲状腺激素; 乙基锡初紫红素(tin ethyl etiopurpurin); 替拉扎明; 二氯化二茂钛(titanocene bichloride); topsentin; 托瑞米芬; 全能干细胞因子; 翻译抑制剂; 维甲酸; 三乙酰尿苷; 曲西瑞宾; 三甲曲沙; 曲普瑞林; 托烷司琼; 妥罗雄脲; 酪氨酸激酶抑制剂; 酪氨酸磷酸化抑制剂(tryphostin); UBC抑制剂; 乌苯美司; 泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子; 尿激酶受体拮抗剂; 伐普肽; variolin B; 载体系统; 红细胞基因治疗; 维拉雷琐; 藜芦胺; verdins; 维替泊芬; 长春瑞滨; 威科萨汀(vinxaltine); vitaxin; 伏罗唑; 扎诺特隆; 折尼铂; 亚苡维C(zilasorb); 和净司他丁斯酯。在一个实施方案中, 抗癌药物是5-氟尿嘧啶、紫杉酚或甲酰四氢叶酸。

[0324] 方法

[0325] 在各个实施方案中, 本发明的组合物和方法利用人溶细胞性T细胞(CTL), 如识别与所选MHC分子, 例如HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24结合的MUC1、T或CEA表位的那些细胞。可选择表达某些血清型例如HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24的MHC分子的个体用于使用本发明的方法和组合物的治疗。例如, 可选择表达某些血清型例如HLA-A2、HLA-A3和HLA-A24的MHC分子的个体用于使用本文所述的方法和组合物的治疗, 包括增强对MUC1、T或CEA的免疫应答。

[0326] 在各个实施方案中, 可通过使用经感兴趣的表位脉冲的抗原呈递细胞刺激外周血单核细胞的体外培养来生成这些T细胞。此外, 还可在用MUC1、T或CEA乳胶珠, MUC1、T或CEA蛋白脉冲的可塑贴壁外周血单核细胞, 或者经MUC1、T或CEA RNA敏化的DC刺激后生成T细胞系。还可从用编码MUC1、T或CEA免疫原的疫苗载体免疫的患者生成T细胞。来自MUC1、T或CEA的HLA A2呈递的肽可进一步在原发性胃肠肿瘤中找到。在各个实施方案中, 本发明涉及MUC1、T或CEA、9个氨基酸的序列CAP-1 (YLSGANLNL; SEQ. ID. NO.: 4) 的HLA A2限制性表位, 该表位具有刺激用疫苗MUC1、T或CEA免疫的患者的癌症的CTL的能力。Cap-1 (6D) (YLSGADLNL; SEQ. ID. NO.: 10) 是CAP-1的肽类似物。其序列包括不规则的(非锚定位置)突变, 从而导致从Asn到Asp的氨基酸变化, 增强了T细胞受体的识别。Asn到Asp突变似乎不会引起肽与HLA A2结合的任何变化。与未突变的CAP-1表位相比, Cap-1 (6D) 可使CTL的敏化作用增强100至1000倍。可通过对Cap-1 (6D) 肽的体外敏化(但对CAP-1肽不显著) 从健康志愿者的外周血单核细胞产生CTL系。这些细胞系可裂解表达内源CEA的人类肿瘤细胞。因此, 包含CAP-1或CAP-1 (6D) 的多肽序列、编码这样的序列的核酸序列、腺病毒载体, 例如包含这样的核酸序列的复制缺陷型腺病毒载体在本发明的范围内。

[0327] 治疗的方法

[0328] 本发明的腺病毒载体可用于许多种疫苗环境中, 以产生针对本文所述的一种或多种靶抗原的免疫应答。本发明提供了产生针对任何靶抗原, 如本文别处所述的靶抗原的免疫应答的方法。腺病毒载体由于以下意想不到的发现而特别重要: 它们可用于在具有预先存在的对Ad的免疫力的受试者中产生免疫应答, 并且可用于包括使用腺病毒载体进行多轮

免疫的疫苗接种方案,使用上一代腺病毒载体是不可能进行这些方案的。

[0329] 通常,产生免疫应答包括诱导体液应答和/或细胞介导的应答。可能期望增加针对感兴趣的靶抗原的免疫应答。产生免疫应答可涉及免疫系统的某些细胞的活性和/或数目的降低或某些细胞因子或其他效应分子的水平或/或活性的降低。用于检测免疫应答中的变化(例如,细胞数目、细胞因子表达、细胞活性)的多种方法是本领域已知的,并且可用于本发明的上下文中。用于本文中的说明性方法包括细胞内细胞因子染色(ICS)、ELISpot、增殖测定、细胞毒性T细胞测定(包括铬释放或等同测定)和使用任何数目的聚合酶链反应(PCR)的基因表达分析或基于RT-PCR的测定。

[0330] 产生免疫应答可包括与对照相比施用本发明腺病毒载体的受试者中1.5至5倍的靶抗原特异性CTL活性增加。在另一个实施方案中,产生免疫应答包括与对照相比施用腺病毒载体的受试者中约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、15、16、17、18、19、20倍或更多倍的靶标特异性CTL活性增加。

[0331] 产生免疫应答可包括与适当的对照相比施用包含编码靶抗原的核酸的本发明腺病毒载体的受试者中1.5至5倍的靶抗原特异性HTL活性,如辅助性T细胞增殖的增加。在另一个实施方案中,产生免疫应答包括与对照相比约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、15、16、17、18、19、20倍或更多倍的靶标特异性HTL活性增加。在本文中,HTL活性可包括如上所述的增加或降低特定细胞因子,如干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或其他细胞因子的产生。在这方面,产生免疫应答可包括从Th2型应答到Th1型应答的转变,或在某些实施方案中,从Th1型应答到Th2型应答的转变。在其他实施方案中,产生免疫应答可包括主要为Th1或Th2型应答的刺激。

[0332] 产生免疫应答可包括与适当的对照相比施用本发明腺病毒载体的受试者中1.5至5倍的靶标特异性抗体产量增加。在另一个实施方案中,产生免疫应答包括与对照相比施用腺病毒载体的受试者中约2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、15、16、17、18、19、20倍或更多倍的靶标特异性抗体产量增加。

[0333] 因此,本发明提供了用于产生针对感兴趣的靶抗原的免疫应答的方法,该方法包括向个体施用腺病毒载体,该腺病毒载体包含:a)复制缺陷型腺病毒载体,其中该腺病毒载体在E2b区具有缺失,和b)编码靶抗原的核酸;以及向个体重复施用腺病毒载体至少一次;从而产生针对靶抗原的免疫应答。在某些实施方案中,本发明提供了其中施用的载体不是无内容载体的方法。在具体的实施方案中,靶抗原可以是野生型蛋白,其片段、变体或变体片段。在一些实施方案中,靶抗原包括MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA,其片段、变体或变体片段。

[0334] 在另外的实施方案中,本发明提供了用于通过以下步骤在个体(其中该个体具有预先存在的对Ad的免疫力)中产生针对靶抗原的免疫应答的方法:向个体施用腺病毒载体,该腺病毒载体包含:a)复制缺陷型腺病毒载体,其中该腺病毒载体在E2b区具有缺失,和b)编码靶抗原的核酸;以及向个体重复施用腺病毒载体至少一次;从而产生针对靶抗原的免疫应答。在具体的实施方案中,靶抗原可以是野生型蛋白,其片段、变体或变体片段。在一些实施方案中,靶抗原包括MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA,其片段、变体或变体片段。

[0335] 关于预先存在的对Ad的免疫力,可使用本领域已知的方法,如用来测试Ad抗体的存在的基于抗体的测定法来确定。此外,在某些实施方案中,本发明的方法包括首先确定个体具有预先存在的对Ad的免疫力,然后施用如本文所述的本发明的E2b缺失型腺病毒载体。

[0336] 本发明的一个实施方案提供了在个体中产生针对一种或多种靶抗原的免疫应答的方法,该方法包括向个体施用包括复制缺陷型腺病毒载体的第一腺病毒载体,其中该腺病毒载体具有在E2b区的缺失,和编码至少一种靶抗原的核酸;向个体施用包括复制缺陷型腺病毒载体的第二腺病毒载体,其中该腺病毒载体具有在E2b区的缺失,和编码至少一种靶抗原的核酸,其中该第二腺病毒载体的至少一种靶抗原与该第一腺病毒载体的至少一种靶抗原相同或不同。在具体的实施方案中,靶抗原可以是野生型蛋白,其片段、变体或变体片段。在一些实施方案中,靶抗原包括MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA,其片段、变体或变体片段。

[0337] 因此,本发明考虑用相同的E2b缺失型腺病毒载体进行多次免疫,或用不同的E2b缺失型腺病毒载体进行多次免疫。在每种情况下,腺病毒载体可包含编码如本文别处所述的一种或多种靶抗原的核酸序列。在某些实施方案中,所述方法包括用编码一种靶抗原的E2b缺失型腺病毒进行多次免疫,以及重复施用相同的腺病毒载体多次,从而诱导针对靶抗原的免疫应答。在一些实施方案中,靶抗原包括MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA,其片段、变体或变体片段。

[0338] 在另外的实施方案中,所述方法包括用编码一种或多种靶抗原的第一腺病毒载体进行免疫,然后用第二腺病毒载体进行施用,该第二腺病毒载体编码可与由第一腺病毒载体编码的那些抗原相同或不同的一种或多种靶抗原。在这方面,其中一种编码的靶抗原可以是不同的,或者所有编码的抗原可以是不同的,或者一些可以是相同的而一些可以是不同的。此外,在某些实施方案中,所述方法包括施用第一腺病毒载体多次,以及施用第二腺病毒多次。在这方面,所述方法包括施用第一腺病毒载体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或更多次,以及施用第二腺病毒载体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或更多次。施用顺序可包括施用第一腺病毒连续一次或多次,然后施用第二腺病毒载体连续一次或多次。在某些实施方案中,所述方法包括如每种施用一次、每种施用两次、每种施用三次等交替施用第一和第二腺病毒载体。在某些实施方案中,同时施用第一和第二腺病毒载体。在其他实施方案中,依次施用第一和第二腺病毒载体。在一些实施方案中,靶抗原包括MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA,其片段、变体或变体片段。

[0339] 如熟练的技术人员将会容易理解的,可在本发明的方法中使用多于两种腺病毒载体。可在本发明的方法中使用3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种不同的腺病毒载体。在某些实施方案中,所述方法包括一次施用多于一种E2b缺失型腺病毒载体。在这方面,可通过同时施用多种不同的腺病毒载体来产生针对感兴趣的多种靶抗原的免疫应答,每种腺病毒载体均包含编码一种或多种靶抗原的核酸序列。

[0340] 腺病毒载体可用于产生针对癌症,如癌或肉瘤(例如,实体瘤、淋巴瘤和白血病)的免疫应答。腺病毒载体可用于产生针对癌症,如神经系统癌症、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、白血病、浆细胞瘤、腺瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肾细胞癌、子宫癌、胰腺癌、食管癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、胃癌、多发性骨髓瘤、肝癌、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)或其他癌症的免疫应答。

[0341] 还提供了用于治疗或改善如本文所述的任何感染性疾病或癌症的症状的方法。治疗的方法包括向患有如本文所述的感染性疾病或癌症或处于患有此类疾病的风险中的个体一次或多次施用腺病毒载体。就此,本发明提供了用于在处于发展这样的疾病的风险中的个体中针对感染性疾病或癌症进行疫苗接种的方法。处于风险中的个体可以是可能在某些时间暴露于感染原或先前暴露但尚未具有感染症状的个体或者具有发展癌症或对感染原特别敏感的遗传倾向的个体。可确定患有本文所述感染性疾病或癌症的个体表达和/或存在靶抗原,从而可用于指导本文的治疗。例如,可找出表达和/或存在靶抗原的实例,随后可施用编码靶抗原、其变体、其片段或其变体片段的腺病毒载体。

[0342] 本发明考虑使用腺病毒载体用于体内递送编码靶抗原或其片段、其变体或其变体片段的核酸。一旦注射到受试者中,核酸序列即被表达,从而导致针对由该序列编码的抗原的免疫应答。可以以“有效量”,即,在选择的途径或施用途径中有效引发如本文别处所述的免疫应答的腺病毒载体的量施用腺病毒载体疫苗。有效量可诱导有效的免疫应答以有助于保护或治疗宿主免受靶感染原或癌症的侵害。在没有通常与典型疫苗相关的显著不良反应的情况下,选择每种疫苗剂量中的载体量作为诱导免疫、免疫保护或其他免疫治疗应答的量。一旦进行了疫苗接种,即可对受试者进行监测以确定疫苗治疗的功效。监测疫苗接种的功效可通过本领域普通技术人员已知的任何方法来进行。在一些实施方案中,可测定血液或流体样品以检测抗体的水平。在其他实施方案中,可进行ELISpot测定以检测来自循环血细胞或来自淋巴组织细胞的细胞介导的免疫应答。

[0343] 本文所述的治疗性组合物的施用途径和频率以及剂量可因个体与个体以及疾病与疾病的不同而不同,并且可使用标准技术容易地建立。通常,可通过注射(例如,皮内、肌肉、静脉内或皮下)、鼻内(例如,通过吸入)、以药丸形式(例如,吞咽、用于阴道或直肠递送的栓剂)施用药物组合物和疫苗。在某些实施方案中,可在52周的时间段内施用1至10个剂量。在某些实施方案中,以1个月的间隔施用6个剂量,并且可在此后定期进行进一步的加强疫苗接种。替代方案可能适合于个体患者。因此,可在1年的时间段或者更短或更长的时间段内,如在35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95周或100周的时间段内施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个剂量。可以以1、2、3、4、5或6周的间隔或更长的间隔施用剂量。

[0344] 可在少于约4小时的时间段内,更优选在少于约3小时的时间段内输注疫苗。例如,第一个25-50mg可在30分钟内,优选甚至15min内输注,而剩余的在接下来的2-3hr内输注。更普遍地,施用的疫苗构建体的剂量可以以每2周或3周一个剂量进行施用,重复总计至少3个剂量。或者,可每周施用两次构建体,持续4-6周。可任选地以其他间隔重复给药方案,并且可通过各种肠胃外途径给予剂量,并适当地调整剂量和时间表。本发明的组合物可与任何数目的相关治疗方式相结合(例如,在该相关治疗方式之前、与该相关治疗方式同时或在该相关治疗方式之后)施用于患者。

[0345] 合适的剂量是在如上所述施用时能够促进如本文别处所述的靶抗原免疫应答的腺病毒载体的量。在某些实施方案中,免疫应答比基线(即,未处理的)水平高至少10-50%。在某些实施方案中,免疫应答是基线水平的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、125、150、200、250、300、400、500倍或更多倍。可通过测量患者的靶抗原抗体或通过能够在体外杀死患者肿瘤或感染细胞的溶细胞

性效应细胞的疫苗依赖性生成或本领域已知的用于监测免疫应答的其他方法来监测这样的应答。与未接种疫苗的患者相比,这样的疫苗还应能够引起免疫应答,从而导致接种疫苗的患者的有问题的疾病的改善的临床结果。在一些实施方案中,改善的临床结果包括治疗疾病、减少疾病症状、改变疾病进展或延长寿命。

[0346] 通常,适当的剂量和治疗方案提供足以提供治疗和/或预防益处的量的腺病毒载体。可通过建立与未治疗患者相比治疗的患者正在治疗的特定疾病的改善的临床结果来监测这样的应答。可随时间评估监测数据。随着时间的推移,疾病的进展可以改变。治疗医师将会容易地认识到临床结果的这些改善。对靶蛋白的预先存在的免疫应答的增加通常可能与改善的临床结果相关。通常可使用标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定来评估这样的免疫应答,并且可使用在治疗之前和之后从患者获得的样品来进行这些测定。

[0347] 虽然本发明的一个优点是能够用相同或不同的腺病毒载体,尤其是在对Ad具有预先存在的免疫力的个体中施用多次疫苗接种,但本发明的腺病毒疫苗还可作为初次和加强方案的一部分进行施用。混合方式的初次和加强接种方案可导致增强的免疫应答。因此,本发明的一个方面是采用质粒疫苗,如包含感兴趣的靶抗原的质粒载体通过以下步骤引发受试者的方法:施用质粒疫苗至少一次,允许预定的时间长度过去,然后通过施用腺病毒载体进行加强。可采用多次引发,例如,1-4次,但也可使用更多次。引发与加强之间的时间长度通常可在约四个月至一年之间变化,但也可使用其他时间范围。在某些实施方案中,可用质粒疫苗引发受试者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次,然后用腺病毒载体在4个月后进行加强。

[0348] 本文提供的任何组合物可施用于个体。“个体”可与“受试者”或“患者”互换使用。个体可以是哺乳动物,例如人或动物,如非人灵长类动物、啮齿动物、兔、大鼠、小鼠、马、驴、山羊、猫、狗、牛、猪或绵羊。在实施方案中,个体是人。在实施方案中,个体是胎儿、胚胎或儿童。在一些情况下,本文提供的组合物施用于离体细胞。在一些情况下,本文提供的组合物作为治疗疾病或病症的方法施用于个体。在一些实施方案中,个体具有遗传性疾病。在一些情况下,个体处于患上疾病,如本文所述的任何疾病的风险中。在一些实施方案中,个体处于患上由蛋白质的量不足或蛋白质的活性不足所引起的疾病或病症的增加了的风险中。如果个体处于患上疾病或病症的“增加的风险”中,则方法涉及防护性或预防性治疗。例如,个体可能由于疾病的家族史而处于患上这样的疾病或病症的增加了的风险中。通常,处于患上这样的疾病或病症的增加了的风险中的个体受益于预防性治疗(例如,通过预防或延迟疾病或病症的发作或进展)。

[0349] 在一些情况下,受试者没有疾病。在一些情况下,本发明的治疗在疾病发作之前施用。受试者可患有未检测到的疾病。受试者可具有低疾病负担。受试者也可具有高疾病负担。在某些情况下,可根据分级量表向受试者施用本发明的治疗。分级量表可以是格里森分类。格里森分类反映了肿瘤组织与正常前列腺组织的差异程度。它使用1至5的评分。医生基于癌细胞的模式和生长给出癌症得分。得分越低,癌细胞看起来越正常并且分级越低。得分越高,癌细胞看起来越不正常并且分级越高。在某些情况下,可向具有低格里森得分的患者施用治疗。优选地,格里森得分为3或更低的患者可施用本发明的治疗。

[0350] 本发明的各个实施方案涉及用于增强针对所选患者群体中的一种或多种MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA抗原的免疫应答的组合物和方法。因此,本发明的方法和组合物可靶

向患有癌症的患者,该癌症包括但不限于癌或肉瘤,如神经系统癌症、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、白血病、浆细胞瘤、腺瘤、神经胶质瘤、胸腺瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肾细胞癌、子宫癌、胰腺癌、食管癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、胃癌、多发性骨髓瘤、肝癌、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL),或者可靶向其他癌症进行治疗。在一些情况下,靶向的患者群体可限于患有结肠直肠癌,转移性结肠直肠癌,表达MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的晚期结肠直肠癌,头颈癌,肝癌,乳腺癌,肺癌,膀胱癌或胰腺癌。可使用所选癌症,例如结肠直肠癌的组织学确认诊断。可选择特定的疾病阶段或进展,例如,可选择患有转移性、复发性、III期或IV期癌症中的一种或多种的患者用于采用本发明的方法和组合物进行治疗。在一些实施方案中,可要求患者已经接受过其他治疗并且任选地通过其他治疗发生进展,该治疗包括但不限于包含氟嘧啶、伊立替康、奥沙利铂、贝伐单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗的治疗。在一些情况下,个体拒绝接受这样的治疗可使患者被纳入采用本发明的方法和组合物的治疗合格库中。在一些实施方案中,可要求接受使用本发明的方法和组合物的治疗的个体具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、18、21或24个月的估计寿命。接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者库可受年龄限制。例如,大于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、50、60岁或更大年龄的个体可符合采用本发明的方法和组合物进行治疗的条件。对于另一个实例,小于75、70、65、60、55、50、40、35、30、25、20岁或更小年龄的个体可符合采用本发明的方法和组合物进行治疗的条件。

[0351] 在一些实施方案中,接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者限于具有足够的血液学功能的个体,例如具有每微升至少1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000或更多的WBC计数,至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14g/dL或更高的血红蛋白水平,每微升至少50,000、60,000、70,000、75,000、90,000、100,000、110,000、120,000、130,000、140,000、150,000或更多的小血小板计数中的一种或多种;具有小于或等于0.8、1.0、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.8、2.0、2.5、3.0或更高的PT-INR值,小于或等于1.2、1.4、1.5、1.6、1.8、2.0X ULN或更高的PTT值的个体。在各个实施方案中,针对不同性别和年龄组中的个体,例如0-5、5-10、10-15、15-18、18-21、21-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80或大于80岁的个体差异性选择血液学功能指标限制。

[0352] 在一些实施方案中,接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者限于具有足够的肾功能和/或肝功能的个体,例如具有小于或等于0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2mg/dL或更高的血清肌酐水平,0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2mg/dL或更高的胆红素水平中的一种或多种,同时允许更高的吉尔伯特综合征限值,例如,小于或等于1.5、1.6、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3或2.4mg/dL,小于或等于正常上限(ULN)的1.5、2.0、2.5、3.0x或更多的ALT和AST值的个体。在各个实施方案中,针对不同性别和年龄组中的个体,例如0-5、5-10、10-15、15-18、18-21、21-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80或大于80岁的个体差异性选择肾功能或肝功能指标限制。

[0353] 在一些实施方案中,可确定使用本发明的方法和组合物进行治疗的候选者个体的K-ras突变状态。可将具有预选K-ras突变状态的个体纳入使用本发明的方法和组合物进行治疗的合格患者库中。

[0354] 在各个实施方案中,接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者限于没有同时进行细胞毒性化疗或放疗,无脑转移史或当前无脑转移,无自身免疫病,诸如但不限于炎症肠病、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性硬化、甲状腺疾病和白癜风的病史,无严重并发性慢性或急性疾病,如心脏病(NYHA III或IV类)或肝病,无阻碍可能依从方案的医疗或心理上的障碍,没有除了非黑素瘤皮肤癌、原位宫颈癌、受控浅表性膀胱癌或已经过治疗的其他原位癌之外的并发性(或最近5年内)第二恶性肿瘤,无主动性急性或慢性感染包括:尿路感染、HIV(例如,通过ELISA测定并通过蛋白质印迹法确认的)和慢性肝炎,或没有同时进行类固醇治疗(或其他免疫抑制剂,如硫唑嘌呤或环孢菌素A)的个体。在一些情况下,可将具有至少3、4、5、6、7、8、9或10周的任何类固醇治疗(除了被用作化疗或对比增强研究的前驱给药)中止的患者纳入使用本发明的方法和组合物进行治疗的合格个体库中。

[0355] 在一些实施方案中,接受使用本发明的方法和组合物的治疗的患者包括患有甲状腺疾病和白癜风的个体。

[0356] 在各个实施方案中,可收集来自使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体的样品,例如血清或尿液样品。可在治疗之前、期间和/或之后收集样品,例如,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,在从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周或12周内,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,在从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周内,在治疗期间以1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周的间隔,在治疗后以1个月、3个月、6个月、1年、2年的间隔,在治疗后1个月、3个月、6个月、1年、2年或更长的时间内,持续收集6个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或更长时间。可针对本文所述的血液学、肾或肝功能指标以及本领域已知的合适的其他指标,例如具有生育潜力的女性的 β -HCG中的任一种对样品进行测试。在这方面,血液学和生化测试,包括分类、PT、INR和PTT的血细胞计数,测量Na、K、Cl、 CO_2 、BUN、肌酐、Ca、总蛋白、白蛋白、总胆红素、碱性磷酸酶、AST、ALT和葡萄糖的测试在本发明的范围内。在一些实施方案中,在来自使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体的样品中确定HIV抗体、肝炎BsAg(Hepatitis BsAg)或丙型肝炎抗体的存在或量。可在来自使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体的样品,如血清中测试生物标志物,如针对MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的抗体或针对Ad5载体的中和抗体。在一些情况下,可从使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体收集一种或多种样品如血液样品并将其归档。可对收集的样品进行测定以用于免疫评估。可在成像研究,例如使用胸部、腹部或骨盆的CT扫描或MRI中对使用本发明的方法和组合物进行治疗的个体或候选个体进行评估。可在使用本发明的方法和组合物进行治疗之前、期间或之后进行成像研究,例如,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,在从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周或12周内,在治疗开始之前2、4、6、8、10周内,从治疗开始的1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周内,在治疗期间以1周、10天、2周、3周、4周、6周、8周、9周或12周的间隔,在治疗后以1个月、3个月、6个月、1年、2年的间隔,在治疗后1个月、3个月、6个月、1年、2年或更长的时间内,持续成像研究6个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或更长时间。

[0357] 剂量和施用

[0358] 本发明的组合物和方法考虑了治疗期间的各种剂量和施用方案。患者可接受一种或多种复制缺陷型腺病毒或腺病毒载体,例如Ad5[E1-,E2B-]-CEA(6D)、Ad5[E1-,E2b-]-

MUC1、Ad5[E1-,E2b-]-MUC1c、Ad5[E1-,E2b-]-MUC1n、Ad5[E1-,E2b-]-T,该腺病毒或腺病毒载体能够增强个体对本文所述靶抗原的免疫应答。在各个实施方案中,以适于产生这样的免疫应答的剂量施用复制缺陷型腺病毒。在一些情况下,以每次免疫大于或等于 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 个或更多个病毒颗粒(VP)的剂量施用复制缺陷型腺病毒。在一些情况下,以每次免疫小于或等于 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1.5×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 个或更多个病毒颗粒的剂量施用复制缺陷型腺病毒。在各个实施方案中,以合适体积的制剂缓冲液,例如约0.1-10mL、0.2-8mL、0.3-7mL、0.4-6mL、0.5-5mL、0.6-4mL、0.7-3mL、0.8-2mL、0.9-1.5mL、0.95-1.2mL或1.0-1.1mL的体积施用本文所述的期望剂量。本领域技术人员认识到该体积可落入由这些值中的任何值所限定的任何范围(例如,约0.5mL至约1.1mL)内。可通过多种合适的递送途径进行病毒颗粒的施用,例如,可通过注射(例如,皮内、肌内、静脉内或皮下)、鼻内(例如,通过吸入)、以药丸形式(例如,吞咽、用于阴道或直肠递送的栓剂)施用病毒颗粒。在一些实施方案中,皮下递送可能是优选的,并且可提供更加接近树突细胞的途径。

[0359] 可重复进行病毒颗粒向个体的施用。病毒颗粒的重复递送可遵循时间表,或备选地可根据需要进行。例如,可对个体对靶抗原,例如MUC1、T和/或CEA的免疫力进行测试并根据需要用额外的递送进行补充。在一些实施方案中,递送时间表包括以规律的间隔施用病毒颗粒。可设计联合递送方案,其包括具有时间表的周期和/或在施用之前评估的基于需要的施用的周期中的一种或多种。例如,治疗方案可包括施用,如每三周一次皮下施用,然后每三个月再进行一次另外的免疫治疗,直到由于包括死亡在内的任何原因而从治疗中去除。另一个示例性方案包括每三周施用三次,然后进行另一组的每三个月三次免疫治疗。另一个示例性方案包括以第一频率进行第一数目的施用的第一周期,以第二频率进行第二数目的施用的第二周期,以第三频率进行第三数目的施用的第三周期等,以及任选的根据需要进行不确定数目的施用的一个或多个周期。每个周期中的施用数目可独立地进行选择,并且可以例如为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20次或更多次。每个周期中的施用频率也可独立地进行选择,可以例如为约每天一次、每隔一天一次、每三天一次、每周两次、每周一次、每隔一周一次、每三周一次、每月一次、每六周一次、每隔一个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每五个月一次、每六个月一次、每年一次等。治疗可需要最长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、30、36个月或更长的总时间段。可对免疫之间的预定间隔进行修改,使得免疫之间的间隔被修改了该间隔的最长五分之一、四分之一、三分之一或一半。例如,对于3周间隔的时间表,可在20至28天之间(3周-1天至3周+7天)进行重复免疫。对于前3次免疫,如果第二次和/或第三次免疫延迟,则可改变随后的免疫,从而允许免疫之间的最小量的缓冲。例如,对于三周间隔的时间表,如果免疫延迟,则可安排随后的免疫在不早于先前免疫后17、18、19或20天发生。

[0360] 可以以各种状态,例如,在室温下、在冰上或以冷冻状态,提供本发明的组合物,如Ad Ad5[E1-,E2B-]-CEA(6D)、Ad5[E1-,E2B-]-MUC1、Ad5[E1-,E2B-]-MUC1c、Ad5[E1-,

E2B-]-MUC1n、Ad5[E1-,E2B-]-T病毒颗粒。可在合适大小的容器中,例如2mL的小瓶中提供组合物。在一个实施方案中,具有1.0mL可提取疫苗的12ml小瓶含有 5×10^{11} 个总病毒颗粒/mL。储存条件,包括温度和湿度,可以变化。例如,用于治疗组合物可储存在室温、4℃、-20℃或更低的温度下。

[0361] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行总体评估。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。

[0362] 总体评估可包括病史、ECOG表现得分、Karnofsky功能状态和由主治医生进行的包括体重的完整身体检查中的一项或多项。可记录患者正在接受的或自上次随访以来直接接受的任何其他治疗、药物、生物制品或血液产品。可在患者接受疫苗后,在诊所跟随其适当的时间段,例如大约30分钟,以监测任何不良反应。可每天对每个剂量疫苗后的局部和全身反应原性进行评估,并持续选定的时间,例如3天(在免疫当天和其后的2天)。可使用日记卡来报告症状,并且可使用标尺来测量局部反应原性。可对免疫注射部位进行评估。可进行胸部、腹部和骨盆的CT扫描或MRI。

[0363] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行血液学和生物化学评估。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。血液学和生物化学评估可包括化学和血液学血液测试,分类CBC,Na、K、Cl、CO₂、BUN、肌酐、Ca、总蛋白、白蛋白、总胆红素、碱性磷酸酶、AST、ALT、葡萄糖和ANA中的一种或多种。

[0364] 在各个实施方案中,评估接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体的生物标志物。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。

[0365] 生物标志物评估可包括来自足够体积的血清样品的针对MUC1、MUC1c、MUC1n、CEA或Ad5载体的测量抗体中的一种或多种,例如,如果约5ml的生物标志物(例如,CEA或CA15-3)已被确定并且可获得,则可对其进行检查。

[0366] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行免疫学评估。可根据需要或按照时间表,如在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。

[0367] 可在每次免疫之前和在至少一些免疫之后的时间抽取例如约90mL的外周血,以确定在研究期间和/或在特定数目的免疫之后的特定时间点是否对免疫应答存在影响。免疫学评估可包括使用ELISpot、增殖测定、多参数流式细胞术分析和细胞毒性测定来测定外周血单核细胞(PBMC)对MUC1、MUC1c、MUC1n、T或CEA的T细胞应答中的一种或多种。可将来自每次血液抽取的血清归档、发送并确定。

[0368] 在各个实施方案中,对接受根据本发明的方法和组合物的治疗的个体进行肿瘤评估。可根据需要或按照时间表,如在治疗之前、在第0周、第3周、第6周等,进行任何测试中的一种或多种。不同组的测试可与免疫同时进行以及在不进行免疫的时间点进行。肿瘤评估可包括在治疗之前、在至少一些免疫之后的时间以及在选定数目完成后(例如第一治疗的2、3或4次,并且例如直到从治疗中去除)大约每三个月进行的胸部、腹部或骨盆的CT或MRI扫描中的一种或多种。

[0369] 可使用一种或多种适用于免疫应答的测试,如ELISpot、细胞因子流式细胞术或抗体应答,从样品如个体的外周血样品评估对本文所述的靶抗原如CEA的免疫应答。可通过测量T细胞应答来确定阳性免疫应答。如果具有抗原的六个孔中调整了背景的斑点的平均数目比六个对照孔中的斑点的数目大10,则T细胞应答可被视为阳性,并且含有抗原的六个孔和六个对照孔的单个值之间的差异在使用Student t检验的 $p \leq 0.05$ 的水平下具有统计学上的显著性。可在每次免疫之前和在治疗周期期间的预定时间点进行免疫原性测定。例如,可在治疗的约第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、18、20、24、30、36或48周安排免疫原性测定的时间点,甚至在该时间不进行预定的免疫。在一些情况下,如果个体接受至少最少数目的免疫,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9次或更多次免疫,则个体可被视为可对免疫应答进行评估。

[0370] 在一些实施方案中,根据患有可测量/可评估疾病的患者中的RECIST 1.1标准进行疾病进展或临床反应测定。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的完全反应(CR;对于靶病变的所有靶病变的消失或所有非靶病变的消失以及非靶病变的肿瘤标志物水平的正常化)。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的部分反应(PR;靶病变的LD总和至少30%的降低,以靶病变的基线总LD作为参考)。

[0371] 在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的疾病稳定(SD;既没有足够的收缩以符合PR,也没有足够的增加以符合PD,以靶病变治疗开始以来的最小总LD作为参考)。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的不完全反应/疾病稳定(SD;一种或多种非靶病变的持续或/和高于非靶病变正常限值的肿瘤标志物水平的维持)。在一些实施方案中,使用本发明的方法和组合物的治疗影响接受治疗的个体的疾病进展(PD;靶病变的LD总和至少20%的增加,以治疗开始以来记录的最小总LD作为参考,或者针对靶病变的一种或多种新病变的出现,或者一种或多种非靶病变的持续或/和高于非靶病变正常限值的肿瘤标志物水平的维持)。

[0372] 试剂盒

[0373] 可以以试剂盒的形式提供组合物、免疫治疗或疫苗。本公开内容的试剂盒可进一步包含包括治疗方案信息在内的关于剂量和/或施用的说明书。

[0374] 在一些实施方案中,试剂盒包括用于提供组合多靶向癌症免疫治疗的组合物和方法。在一些实施方案中,试剂盒包括用于感染性疾病的组合多靶向治疗的组合物和方法。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于施用试剂盒组分的组分和如何制备组分的说明书。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括用于采用适当的实验室测试在治疗之前和之后执行监测患者或与医务人员交流结果和患者数据的软件。

[0375] 试剂盒包含的组分可以为干燥或液体形式。如果它们是干燥形式,则试剂盒可包括溶解该干燥物质的溶液。试剂盒还可包括液体或干燥形式的转移因子。如果转移因子为干燥形式,则试剂盒将包括溶解该转移因子的溶液。试剂盒还可包括用于混合和制备组分的容器。试剂盒还可包括用于协助施用的仪器,例如针、管、涂抹器、吸入器、注射器、移液管、镊子、测量勺、滴眼器或任何这样的医学上批准的递送载具。本发明的试剂盒或药物递送系统通常还将包括用于以紧密约束方式容纳本公开内容的组合物以供商业销售和分布的装置。

[0376] 实施例**[0377] 肽和载体**

[0378] 在该实施例和其他实施例中使用了以下HLA-A2和HLA-A24结合肽：(a) 结合HLA-A2的CEA激动剂肽CAP1-6D (YLSGADLNL)，(b) HLA-A2 MUC1激动剂肽P93L (ALWGQDVTSV)，(c) 结合HLA-A24的MUC1激动剂肽C6A (KYHPMSEYAL)，以及(d) 结合HLA-A2的brachyury激动剂肽(WLLPGTSTV)。所有肽均为大于96%纯。

[0379] 构建并产生Ad5[E1-, E2b-]-brachyury、Ad5[E1-, E2b-]-CEA和Ad5[E1-, E2b-]-MUC1。简言之，使用基于同源重组的方法将转基因亚克隆到Ad5[E1-, E2b-]载体的E1区中。在E.C7包装细胞系中繁殖复制缺陷型病毒，进行CsCl₂纯化并滴定。将病毒感染滴度确定为E.C7细胞单层上的空斑形成单位(PFU)数。通过十二烷基硫酸钠(SDS)破坏以及在260nm和280nm处的分光光度测定来确定VP浓度。CEA转基因还包含含有高免疫原性表位CAP1-6D的经修饰的CEA。

[0380] 通过引入增强子T细胞HLA-A2表位(WLLPGTSTV)并去除参与DNA结合的25个氨基酸片段来修饰编码人brachyury蛋白(T, NM_003181.3)的序列。随后将所得到的构建体亚克隆到Ad5载体中以生成Ad5[E1-, E2b-]-brachyury构建体。

[0381] MUC1分子由两个区域组成：N末端(MUC1-n)，其为MUC1的大胞外结构域；以及C末端(MUC1-c)，其具有三个区域：小胞外结构域、单个跨膜结构域和细胞质尾部。细胞质尾部含有与信号蛋白相互作用的位点，并充当致癌基因以及癌症运动、侵袭和转移的驱动子。对于Ad5[E1-, E2b-]-MUC1的构建，将包括8个激动剂表位在内的整个MUC1转基因亚克隆到Ad5载体中。包含在Ad5[E1-, E2b-]-MUC1载体中的激动剂表位与HLA-A2(N末端中的表位P93L，VNTR区中的V1A和V2A，以及C末端中的C1A、C2A和C3A)、HLA-A3(表位C5A)以及HLA-A24(C末端中的表位C6A)结合。通过以1:1:1的比例组合10¹⁰VP的Ad5[E1-, E2b-]-Brachyury、Ad5[E1-, E2b-]-CEA和Ad5[E1-, E2b-]-MUC1来产生Tri-Ad5疫苗(总共3x10¹⁰ VP)。

[0382] 实施例1：Ad5空壳腺病毒载体的多次注射产生抗腺病毒抗体

[0383] 该实施例显示，Ad5空壳的多次注射导致在注射的受试者中产生抗腺病毒抗体。

[0384] 已经证明，不含任何异源核酸序列的Ad5空壳腺病毒载体在小鼠中产生中和免疫应答。在一个实验中，用Ad5空壳病毒颗粒以14天的间隔对年龄5-7周的雌性Balb/c小鼠进行免疫。为了确定抗腺病毒抗体的存在，使用酶联免疫吸附测定(ELISA)。对于该ELISA，将10⁹个病毒颗粒涂布到在100μL、pH 9.6的0.05M碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液中的微量滴定板孔上，并在室温下温育过夜。对于标准免疫球蛋白G(IgG)参考曲线，如上所述将200ng、100ng、50ng、25ng和0ng的纯化的小鼠IgG涂布到微量滴定板孔上。温育后，用250μL、pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的1%牛血清白蛋白(BSA)将所有孔洗涤3次。洗涤后，向所有孔加入250μL的BSA/PBS，并在室温下温育30分钟以封闭未结合的位点。温育后，用250μL的BSA/PBS将所有孔洗涤3次。洗涤后，向孔中加入200μL在BSA/PBS中的1/100血清稀释液，并在室温下温育1小时。对于阳性对照，向孔中加入200μL在BSA/PBS中的抗腺病毒抗血清的1/10000稀释液。对照孔仅含有BSA/PBS。温育后，用250μL的BSA/PBS将所有孔洗涤3次。洗涤后，向各孔加入200μL在BSA/PBS中的过氧化物酶偶联的γ链特异性山羊抗小鼠IgG(Sigma Chemicals)的1/10000稀释液，并在室温下温育1小时。温育后，用250μL的BSA/PBS将所有孔洗涤3次。洗涤后，向各孔加入200μL显影试剂(在0.2M磷酸钾缓冲液中的0.5mg/mL 1,2-苯二胺，pH

5.0, 含有0.06%过氧化氢), 并在室温下温育30-40分钟。温育后, 通过向各孔加入50 μ L 5N HCl使显色反应停止。然后在微孔板读数器中在492nm下读取各孔读数。获得读数后, 将未知样品的光密度读数与标准IgG曲线关联起来, 以获得每个孔结合的IgG的纳克数。这是使用INSTAT统计软件包来执行的。

[0385] ELISA检测抗CEA抗体

[0386] 用在0.05M、pH 9.6的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的100ng人CEA (Sigma-Aldrich) 涂布ELISA板, 并将该板在室温下温育过夜。用含有1%吐温-20的磷酸盐缓冲盐水 (PBS-T) 将板洗涤3次, 然后用含有1%BSA的PBS在室温下封闭60min。在另外3次洗涤后, 向孔中加入在PBS-T中1/50稀释的血清, 并将板在室温下温育1小时。在洗涤后以1:5000稀释度将过氧化物酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Ig) G (γ -链特异性) (Sigma-Aldrich) 抗体加入孔中, 并将板温育1小时。将板洗涤3次, 并向各孔加入1,2-苯二胺底物溶液。通过加入10%磷酸使反应停止。在SpectraMax 190ELISA读数器上测量492nm处的吸光度。通过参照使用纯化的小鼠IgG而生成的、与CEA ELISA同时生成的标准曲线来获得每个孔中与CEA结合的IgG纳克当量。使用SoftMax Pro 6.3软件对结果进行分析和定量。

[0387] 在用 10^{10} Ad-5空壳进行第一次注射后2周, 在小鼠中检测到显著水平 ($P < 0.001$) 的抗腺病毒IgG抗体 (图1)。在用 10^{10} 腺病毒进行第二次注射后2周观察到显著更高的水平 ($P < 0.001$)。在用 10^{10} Ad5空壳进行第三次注射后2周继续观察到显著更高的抗体水平 ($P < 0.001$)。每个值代表来自各组中5只小鼠的合并血清的一式三份测定的平均值。Ad5空壳的多次注射导致在受试者中产生抗腺病毒抗体。

[0388] 为了确定针对Ad的中和抗体的存在, 使用以下测定法。在微孔组织培养板中的200 μ L由含有10%胎牛血清的DMEM (DMEM/FCS) 组成的培养基中, 以 2×10^3 个细胞/孔的细胞浓度将HEK-293T细胞系在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中培养24小时。温育后, 从一式三份的孔中取出100 μ L培养基, 并与20 μ L含有病毒颗粒 (VP) 的DMEM/FCS混合。混合后, 将120 μ L混合物加回到各自的微孔中。在另一组一式三份的孔中, 取出100 μ L培养基, 并与先前与VP在室温下一同温育1小时的20 μ L热灭活 (56 $^{\circ}$ C 1h) 的Ad免疫小鼠血清混合。混合后, 将120 μ L混合物加回到各自的孔中。在一式三份的细胞对照孔中, 将20 μ L的DMEM/FCS加入对照孔达到总培养基体积。一式三份仅含培养基的对照孔含有220 μ L的DMEM/FCS。将组织培养板在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中再温育3天。温育后, 向所有孔中加入40 μ L的PROMEGA细胞活力试剂 (Owen试剂), 并在37 $^{\circ}$ C下、5%CO₂中温育75分钟。在该测定中, Owen试剂 (MTS四唑化合物) 被活细胞生物还原成可溶于组织培养基的有色甲瓚产物。通过在490nm处的吸光度所测量的甲瓚产物的数量与培养物中活细胞的数目成正比。温育后, 从各孔取出150 μ L, 并转移到另一个微孔板用于光密度读数。随后使用微孔板读数器获得492nm处的光密度读数。

[0389] 为了检测针对Ad的中和抗体的存在, 以两周的间隔用 10^{10} Ad5空壳将5只小鼠的组注射一次、两次或三次。在最后一次病毒注射后两周, 将小鼠放血, 合并, 并使用与或不与热灭活血清一起温育的 4×10^7 个VP评估如上所述的中和抗体。只进行培养的细胞用作对照组。正常小鼠和用Ad5空壳注射一次的小鼠未显示出显著水平的中和抗体 (图2)。与仅与病毒一起温育的细胞相比, 用Ad注射两次的小鼠显示出显著 ($P < 0.05$) 水平的中和抗体。与仅与病毒一起温育的细胞相比, 用Ad5空壳注射三次的小鼠也显示出显著 ($P < 0.01$) 水平的中和抗体。

[0390] 实施例2:Ad5[E1-]-CEA载体疫苗基于Ad5免疫小鼠中的再免疫诱导CEA特异性免疫应答

[0391] 该实施例显示,Ad5[E1-,E2b-]载体平台在小鼠中预先存在的Ad5免疫力存在的情况下诱导对肿瘤相关抗原(TAA)癌胚抗原(CEA)的CMI应答。

[0392] Ad5 CEA载体的表征

[0393] 进行初步研究以确认两种Ad5-CEA载体平台的CEA基因表达。首先确定CEA抗原可在用疫苗载体平台转染的细胞上表达。A549细胞获自ATCC,并用Ad5[E1-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-CEA进行转染。蛋白质印迹分析显示,用载体平台转染的细胞表达CEA抗原(图35)。

[0394] 方法

[0395] 用Ad5[E1-,E2b-]-CEA以555个VP/细胞的MOI接种A549细胞。将细胞在37℃下、5%CO₂中温育48小时。48小时后,收获细胞并将细胞用PBS洗涤并冷冻/解冻三次。将全细胞裂解物在70℃下加热10min,然后加载到凝胶上。以30ng/泳道加载重组CEA对照,并以20μL/泳道加载制备的裂解物。包含样品加载缓冲液作为额外的阴性对照,而阳性对照为Magic Mark CP Western标志物和重组CEA。将凝胶转移到硝酸纤维素膜,并用SuperBlock封闭溶液封闭60min。用小鼠单克隆抗CEA第一抗体(1:1000)和第二抗小鼠HRP(1:2500)偶联抗体探测该膜。将该膜洗涤3次,然后与SuperSignal化学发光试剂一起温育,并通过使X射线胶片暴露于膜,随后进行显影而使条带可视化。

[0396] 小鼠中Ad5免疫力的诱导

[0397] 为了评估可被诱导的Ad5免疫力的水平,用Ad5载体平台(VP)皮下注射Ad5未处理(naive)C57B1/6小鼠组。28至42天后,收集血清样品并评估终点Ad5 NAb滴度。如图3中所示,在正常对照小鼠中观察到不可检测的Ad5 NAb滴度(终点Ad5 NAb滴度<1/25)。Ad5 NAb(1/25至1/50的终点滴度)在一次注射后可检测到,但在三次注射10¹⁰Ad5后显著增加。因此,在额外的Ad5免疫研究中,用10¹⁰Ad5 VP注射小鼠两次以使动物对Ad5免疫。

[0398] 用Ad5[E1-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-CEA进行Ad5免疫小鼠的免疫

[0399] 设计这些实验来确定并比较Ad5[E1-]-CEA和Ad5[E1-,E2b-]-CEA疫苗在Ad5免疫小鼠中的免疫诱导潜力。用10¹⁰Ad5空壳VP以2周间隔将4至8周龄的雌性C57B1/6小鼠组免疫2次。在最后一次Ad5空壳免疫后两周,用10¹⁰VP的Ad5[E1-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-CEA以一周间隔将小鼠免疫3次。在最后一次免疫后两周,使小鼠安乐死,并收获小鼠的脾和血清用于分析。

[0400] 通过对暴露于完整CEA抗原的脾细胞进行的ELISpot测定来评估CMI应答。收获来自用Ad5[E1-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-CEA皮下免疫的Ad5免疫C57B1/6小鼠的脾细胞,并如上所述评估分泌IFN-γ和IL-2的细胞的数目。与免疫的Ad5[E1-]-CEA小鼠相比,在用Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫的小鼠的测定的脾中观察到分泌IFN-γ和IL-2的细胞的数目均显著增加(图4A和图4B)。特异性研究显示,用Ad5 CEA载体进行的免疫诱导特异性CEA相关CMI应答,而不对其他不相关抗原如HIV-gag蛋白或β-半乳糖苷酶产生应答。这些结果表明,用Ad5[E1-,E2b-]-CEA对Ad5免疫小鼠进行的免疫诱导显著更高的CMI应答。

[0401] 免疫小鼠中缺乏不良肝反应

[0402] 对来自如上所述用Ad5[E1-]-CEA、Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫的Ad5免疫雌性C57B1/6小鼠的血清进行毒性研究。Ad5未处理小鼠或只注射缓冲液的Ad5免疫小鼠作为对照。在第

三次免疫后三天,评估血液样品的天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平,以确定由于治疗而引起的肝毒性。在用任一种载体免疫后,AST水平相对于对照均未升高(图5)。还对丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平进行了评估,并观察到了相似的结果。

[0403] 携带Ad5免疫肿瘤的小鼠的Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫治疗

[0404] 基于上文观察到的成功的免疫学结果,如下所述进行在小鼠中建立MC38肿瘤然后进行治疗的研究。对于这些研究,使用表达CEA的MC38鼠细胞系。该细胞系已经经过基因修饰以表达人CEA并且可植入到C57B1/6小鼠中。肿瘤建立后,用新型Ad5[E1-,E2b-]-CEA载体平台治疗小鼠。为了确定是否可用Ad5[E1-,E2b-]-CEA载体治疗携带Ad5免疫肿瘤的小鼠,将C57B1/6小鼠用 10^{10} Ad5[E1-]-空壳VP以14天的间隔皮下注射两次,以使小鼠对Ad5免疫。在最后一次注射后两周,用 10^6 个表达CEA的MC38肿瘤细胞皮下注射两组的7只C57B1/6小鼠。七天后,当肿瘤可显现时,通过在第7、13和19天远端皮下注射 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-CEA来治疗一组小鼠。一组的7只仅注射缓冲液处理的C57B1/6小鼠作为未治疗对照。在21天的时间段内监测所有小鼠的肿瘤大小,并如前所述确定肿瘤体积。

[0405] 在Ad5[E1-,E2b-]-CEA治疗的小鼠中,第19天的肿瘤生长显著降低,并保持如此(图6)。在研究结束时(第22天),处死小鼠,并将肿瘤切除并称重。进行肿瘤测量并确定体积。使用Bonferroni测试后分析采用PRISM软件进行统计分析。用Ad5[E1-,E2b-]-CEA治疗的小鼠的肿瘤的重量显著($P<0.05$) 小于未治疗对照(图7)。

[0406] 在研究终止时,从小鼠收集脾,并通过ELISpot测定来确定CEA特异性CMI应答。用Ad5[E1-,E2b-]-CEA免疫的小鼠中的CEA特异性IFN- γ 分泌应答显著高于只接受MC-38肿瘤细胞的小鼠中的CEA特异性IFN- γ 分泌应答。这些结果表明,使用Ad5[E1-,E2b-]-CEA疫苗治疗Ad5免疫小鼠中表达CEA的肿瘤可显著降低肿瘤生长进展。

[0407] 实施例3:针对感染后A549细胞上CEA表达的定量ELISA

[0408] 该实施例示出了使用Ad5[E1-,E2b-]CEA载体转导人肺癌细胞系A-549的剂量反应评估。结果显示,CEA抗原可以以剂量依赖方式进行表达。

[0409] 实验设计

[0410] 在测定的第一天,将在三天前传代的A549细胞(批号30Ju102,传代p+23次)(7.7×10^3 个细胞/孔)接种到BD Falcon组织培养96孔板中,并将该板置于在 $5 \pm 2\%$ CO₂气氛下的 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养箱中过夜。

[0411] 第二天,制备试验品的稀释系列,并以在 1.56×10^3 至 2.5×10^4 个病毒颗粒/孔范围内的水平接种重复的孔。未处理的A549细胞用作模拟样品。在测定的第四天,用10% Triton X-100溶液处理孔用于通过ELISA进行分析以测量CEA浓度。对于ELISA,用抗CEA捕捉抗体(abcam癌胚抗原CEA抗体[NCRC16 (AKA161)])将微量滴定板包被过夜。洗涤孔以去除未结合的反应物,并将板用含有1%吐温20的磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液封闭以落入标准曲线的范围内。在封闭期后,洗涤孔,并在指定的一式三份孔中温育样品、对照和标准物。通过洗涤去除未结合的反应物,并加入针对CEA检测抗体的兔多克隆抗体。温育后,洗涤孔并与过氧化物酶底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)一起温育。底物在酶存在的情况下形成有色产物,用1M磷酸溶液使反应停止,并在校准的酶标仪上测定吸光度。从含有已知浓度的CEA的标准物生成校准曲线,并使用该曲线来确定样品中CEA的浓度。在对稀释度和感染复数(MOI)进行调整后,从通过ELISA测量的CEA浓度计算每个病毒颗粒产生的CEA的数量。减去

以相似方式确定的只含培养基的值以补偿培养基中存在的背景水平。样品分析在表2中示出。

[0412] 表2

[0413]

样品 ID	A ₄₅₀ - A ₅₄₀ Rep 1	Rep 2	平 均 值	SD	RSD	空 白 底 物	ELIS A 稀 释倍 数	CEA (ng/ ml)	AVG CEA (ng/m L)	总 CEA (ng/m L)	CEA (ng/v p)
2.5E+04 vp 的 10-00291 7 孔 1	1.33 87	1.29 77	1.31 8	0.02 9	2.2 %	1.24 4	1000	7,731	7,691	7,621	0.30
	0.71 21	0.67 89	0.69 3	0.02 3	3.4 %	0.62 2	2000	7,797			
	1.17 17	1.13 29	1.15 2	0.02 7	2.4 %	1.07 8	1000	6,563			
	0.62 22	0.61 51	0.61 9	0.00 5	0.8 %	0.54 5	2000	6,975			
	1.16 59	2.04 92	1.60 8	0.62 5	38.9 %	1.53 4	1000	10,26 4			
	0.61 31	0.59 46	0.60 4	0.01 3	2.2 %	0.53 0	2000	6,815			
1.25E+04 vp 的 10-00291 7 孔 1	1.10 51	1.07 59	1.09 1	0.02 1	1.9 %	1.01 7	1000	6,169	6,049	5,979	0.48
	0.59 70	0.57 16	0.58 4	0.01 8	3.1 %	0.51 0	2000	6,602			
	1.06 52	1.03 76	1.05 1	0.02 0	1.9 %	0.97 7	1000	5,919			
	0.57 26	0.57 70	0.57 5	0.00 3	0.5 %	0.50 1	2000	6,506			
	0.97 31	0.95 14	0.96 2	0.01 5	1.6 %	0.88 8	1000	5,383			
	0.50 49	0.49 70	0.50 1	0.00 6	1.1 %	0.42 7	2000	5,716			
6.25E+03 vp 的 10-00291 7 孔 1	0.76 01	0.72 10	0.74 1	0.02 8	3.7 %	0.66 7	1000	4,141	4,286	4,216	0.67
	0.40 41	0.38 81	0.39 6	0.01 1	2.9 %	0.32 2	2000	4,566			
	0.71 57	0.70 68	0.71 1	0.00 6	0.9 %	0.63 7	1000	3,979			
	0.38 93	0.38 43	0.38 7	0.00 4	0.9 %	0.31 3	2000	4,465			

[0414]

6.25E+03 vp 的 10-00291 7 孔 3	0.73 60	0.71 88	0.72 7	0.01 2	1.7 %	0.65 3	1000	4,065			
	0.39 95	0.38 07	0.39 0	0.01 3	3.4 %	0.31 6	2000	4,499			
3.13E+03 vp 的 10-00291 7 孔 1	0.89 20	0.88 78	0.89 0	0.00 3	0.3 %	0.81 6	500	2,483	2,690	2,620	0.84
	0.45 73	0.46 13	0.45 9	0.00 3	0.6 %	0.38 5	1000	2,631			
3.13E+03 vp 的 10-00291 7 孔 2	0.86 15	0.85 44	0.85 8	0.00 5	0.6 %	0.78 4	500	2,393			
	0.44 25	0.44 06	0.44 2	0.00 1	0.3 %	0.36 8	1000	2,538			
3.13E+03 vp 的 10-00291 7 孔 3	1.05 18	1.04 64	1.04 9	0.00 4	0.4 %	0.97 5	500	2,953			
	0.55 19	0.55 65	0.55 4	0.00 3	0.6 %	0.48 0	1000	3,141			
1.56E+03 vp 的 10-00291 7 孔 1	1.87 71	1.86 16	1.86 9	0.01 1	0.6 %	1.79 5	100	1,351	1,271	1,201	0.77
	1.19 63	1.16 95	1.18 3	0.01 9	1.6 %	1.10 9	200	1,354			
1.56E+03 vp 的 10-00291 7 孔 2	1.74 35	1.74 36	1.74 4	0.00 0	0.0 %	1.67 0	100	1,179			
	1.09 60	1.07 88	1.08 7	0.01 2	1.1 %	1.01 3	200	1,229			
1.56E+03 vp 的 10-00291 7 孔 3	1.78 01	1.80 98	1.79 5	0.02 1	1.2 %	1.72 1	100	1,245			
	1.10 41	1.12 63	1.11 5	0.01 6	1.4 %	1.04 1	200	1,264			
模拟的 10-00291 7 孔 1	1.25 09	1.22 78	1.23 9	0.01 6	1.3 %	1.16 5	10	72	70	0	-
	0.71 46	0.69 52	0.70 5	0.01 4	1.9 %	0.63 1	20	79			
模拟的 10-00291 7 孔 2	1.22 90	1.23 82	1.23 4	0.00 7	0.5 %	1.16 0	10	71			
	0.72 46	0.71 33	0.71 9	0.00 8	1.1 %	0.64 5	20	80			
模拟的 10-00291 7 孔 3	0.97 69	0.97 50	0.97 6	0.00 1	0.1 %	0.90 2	10	55			
	0.55 79	0.54 54	0.55 2	0.00 9	1.6 %	0.47 8	20	63			

[0415] 实施例4:免疫安全性数据的时间表、剂量、途径

[0416] 进行初步临床前研究以评估并确认Ad5[E1-, E2b-]载体平台可在转染的细胞上表达抗原蛋白。用疫苗平台转染A-549细胞,并通过蛋白质印迹分析对该细胞进行分析(图8)。一旦用Ad5[E1-, E2b-]载体平台转染抗原蛋白如HIV-gag、HIV-pol或HIV-nef,即可观察到这些抗原蛋白在细胞上表达。

[0417] 使用Ad5[E1-, E2b-]载体平台进行剂量反应评估,并证明,10¹⁰个病毒颗粒(VP)是在鼠模型中导致对转基因产物的期望CMI应答的剂量。通过利用ELISpot测定检测来自小鼠脾的分泌干扰素- γ (IFN- γ)和IL-2的细胞(脾细胞)来评估CMI应答。此外,在鼠和非人灵长类动物(NHP)模型中,使用10¹⁰个VP分别隔开两周至四周进行的三次免疫导致期望的CMI应答。在小鼠中,与仅进行一次免疫相比,在多次免疫后观察到更大程度的CMI应答(图9)。

[0418] 在NHP模型中,通过用野生型Ad5病毒注射使动物对Ad5免疫。当Ad5中和抗体滴度达到1:50或更高时,确认动物对Ad5免疫,以 1×10^{10} 个VP的剂量、以30天的间隔用Ad5-[E1-, E2b-]-gag将动物皮内免疫3次。在最后一次疫苗接种后32天和第一次免疫后124天(野生型Ad5),NAb滴度等于或大于1:1000。在免疫后,当评估动物的外周血单核细胞(PBMC)的分泌IFN- γ 和IL-2的细胞时,检测到稳定的CMI应答的存在(图10)。

[0419] 除了以上所示在3个NHP中的初始疫苗试验中进行的初步免疫学研究之外,还对用Ad5[E1-, E2b-]-HIV gag接种的相同NHP进行了毒性研究。在研究期间评估动物温度和体重。在研究期间,动物随着生长而体重增加。在研究期间没有观察到温度差异。还对接种的NHP进行了血液学研究。在第二次疫苗接种后2周白细胞计数似乎小幅增加,此后则正常化。

[0420] 除了数值波动外,研究过程中似乎没有血液学数值方面的其他差异。在研究过程中,还在NHP中确定了化学值。碱性磷酸酶水平在研究过程中略有下降,但仍保持在正常范围内。白蛋白水平在研究过程中略有下降,但仍保持在正常水平。在研究过程中没有观察到血液化学方面的其他差异。由于DC位于真皮中的优势而选择该临床研究中的免疫途径。

[0421] 使用采用CEA和其他转基因的Ad5[E1-, E2b-]平台诱导期望水平的CMI应答。使用Ad5[E1-, E2b-]-CEA载体平台,将非Ad5免疫小鼠和Ad5预先免疫小鼠用疫苗注射三次。免疫后,通过ELISpot评估来自小鼠的脾细胞的分泌IFN- γ 的细胞。在免疫后观察到升高的CMI应答,并且在非Ad5免疫和Ad5预先免疫的小鼠中的CMI应答水平是相似的(图11)。这些结果表明,不论预先存在的Ad5免疫力存在与否,均可诱导稳定的CMI应答。设计了III期临床研究,该研究经由针皮下递送方法进行隔开三周的三次免疫。

[0422] 时间表、剂量、施用途径的原理

[0423] 临床研究设计来自使用Ad5[E1-, E2b-]载体平台的动物和人类中的临床前和临床研究。进行了使用Ad5[E1-, E2b-]载体平台的剂量反应评估,并证明, 10^{10} 个VP是在鼠模型中导致对转基因产物的期望CMI应答的剂量。此外,在鼠和非人灵长类动物(NHP)模型中,使用 10^{10} 个VP分别隔开两至四周进行的三次免疫导致期望的CMI。由于树突细胞(DC)位于真皮中的优势而选择该免疫途径。通过使用这一前提,使用皮下注射方案进行了多次鼠和NHP研究。使用采用CEA和其他转基因的Ad5[E1-, E2b-]平台诱导期望水平的循环CMI。III期临床研究后经由针皮下(SQ)递送方法进行隔开三周的三次免疫,其中每三个月继续进行免疫治疗,直到由于包括死亡在内的任何原因而从研究中去除。

[0424] 概述

[0425] 产生含有具有CAP1 (6D) 突变的经修饰的CEA的cDNA序列。使用E.C7细胞系构建并生产临床级Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D)。总计34名患者(32名结肠直肠癌患者,1名膀胱癌患者和1名肺癌患者)进入IND14325下的I/II期临床研究。大多数接受所有三次预定的采用Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D)的免疫治疗。早期停止免疫治疗的5名患者由于显著的疾病进展而停止免疫治疗。完成了使用在基线时和治疗后获得的CT或MRI扫描的RECIST 1.0标准。根据美国国家癌症研究所关于不良事件的常用术语标准(CTCAE) 4.0版评估毒性。比较基线与免疫治疗开始后9周的外周血CEA水平、血液学、血清化学和抗核抗体滴度。检测从第一次免疫当天直到由于任何原因而死亡的存活。

[0426] 向患者施用总计94次治疗。没有发生导致任何治疗剂量水平下治疗中止的剂量限制性毒性或严重不良事件(SAE)。在血液血液学数值方面仅存在一个显著变化。作为一个

组,嗜碱性粒细胞计数在第9周,即治疗结束后3周时显著降低。然而,该值仍保持在嗜碱性粒细胞计数的正常范围内,并且总体上似乎没有显著的生物学效应。对于7.4个月的中位随访期,所有34名患者作为一组(队列1、2、3/II期和队列5)经历了41.4%的12个月存活率。在进入研究中的34名患者中,28名患者接受了3次免疫治疗并经历了55%的12个月存活率。对于结肠直肠癌患者,27名患者接受了3次免疫治疗并经历了53%的12个月存活率。观察到对增加水平的Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)的剂量反应,并且在接受Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)的 5×10^{11} 个VP的最高剂量的患者中发生最高的细胞介导的免疫(CMI)应答。当比较最高的CEA特异性CMI应答与预先存在的或载体诱导的Ad5 NAb活性时,CEA特异性CMI与Ad5中和抗体(NAb)水平之间无相关性。这些临床试验数据促使我们相信,存在足够的数据推进到用于治疗转移性结肠直肠癌、以总存活期为临床终点的随机化III期试验。

[0427] 方案和患者治疗

[0428] 根据FDA批准的“研究性新药豁免(Investigational New Drug Exemption)”进行临床研究,并在ClinicalTrials.gov上注册。从杜克大学医学中心(NC)和医学肿瘤学会(WA)的医学肿瘤诊所招募参与者。向患者提供由各机构审查委员会(IRB)批准的知情同意书。资格要求包括表达CEA的转移性癌症和足够的血液学、肾和肝功能。要求试验参与者曾接受过采用已知具有可能的总生存益处的标准治疗进行的治疗或拒绝了这样的治疗。排除标准包括在前4周内的化疗或放疗、自身免疫病史、病毒性肝炎、HIV或免疫抑制剂的使用。允许在招募前接受过至少3个月的贝伐单抗或西妥昔单抗的患者继续接受这些抗体。先前的CEA免疫治疗是允许的。该研究采用标准3+3剂量递增策略,并将剂量限制性毒性(DLT)定义为3级或4级主要器官毒性。将Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)剂量如下递送至患者:队列1:每3周在同一大腿皮下(SQ)接受0.5mL的 1×10^9 个VP的剂量,共3次免疫;队列2:每3周皮下接受0.5mL的 1×10^{10} 个VP的剂量,共3次治疗;队列3:每3周皮下接受0.5mL的 1×10^{11} 个VP的剂量,共3次治疗。在建立 1×10^{11} 个VP的剂量安全后,另外12名患者按照该剂量和时间表(II期队列)接受Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)。在完成II期队列后,另外的队列(队列5)的六(6)名患者每3周皮下接受2.5mL的 5×10^{11} 个VP的剂量,共3次治疗,以确定最高可实现剂量的安全性。在第0、3、6周免疫之前和最后一次治疗之后的3周,从患者收集PBMC。将PBMC在液氮中冷冻直到进行ELISpot测定。在队列5中,在初步流式细胞术测定中分析新鲜PBMC的多功能CD8+T淋巴细胞。

[0429] 临床活性评估

[0430] 根据实体瘤响应评估标准(RECIST 1.0标准),使用在基线时和治疗完成后获得的计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)扫描评估临床活性。根据美国国家癌症研究所关于不良事件的常用术语标准(CTCAE) 4版评估毒性。比较基线时与最终治疗后3周的外周血CEA水平、血液学、血清化学和抗核抗体滴度。检测从第一次免疫当天直到由于任何原因而死亡的存活。

[0431] 通过ELISpot测定分析CMI应答

[0432] 进行针对分泌IFN- γ 的淋巴细胞的ELISpot测定。简言之,将来自个体患者样品的分离的PBMC(2×10^5 个细胞/孔)与CEA肽库(具有覆盖具备6D修饰的全长CEA的11aa重叠的15mer;0.1 μ g/孔)一起温育36-40h,以刺激产生IFN- γ 的T细胞。在患者PBMC暴露于Ad5空壳(空载体)后,确定对Ad5的CMI应答。将用0.25 μ g/孔浓度的伴刀豆球蛋白A(Con A)刺激的细

胞作为阳性对照。使用Immunospot ELISpot板读数器对着色的斑点形成细胞(SFC)进行计数,如果减去阴性对照后检测到50个SFC/10⁶个细胞,并且SFC为阴性对照孔SFC的≥2倍,则应答被视为是阳性的。

[0433] Ad5中和抗体(NAb)滴度的确定

[0434] 确定终点Ad5 NAb滴度。简言之,将在100μL含有10%胎牛血清的DMEM中的热灭活测试血清稀释液与4x10⁷ VP的Ad5[E1-]-空壳混合,并在室温下温育60分钟。将样品加入到含有HEK293细胞的微孔中,在含有10%热灭活小牛血清的DMEM中以2x10³个细胞/孔在37℃下、5%CO₂中培养24小时。将混合物在37℃下、5%CO₂中再温育72小时。使用MTS四唑生物还原测定法来测定细胞杀伤和终点Ad5 NAb滴度。值小于1:25的终点滴度被赋值为0。

[0435] 统计学

[0436] 采用Mann-Whitney检验(PRISM,Graph Pad)进行比较免疫应答的统计分析。采用Kaplan-Meier图(PRISM,Graph Pad)进行存活期比较。将Ad5 NAb滴度和CEA特异性CMI作为连续变量进行分析。用斯皮尔曼相关系数检验Ad5 NAb滴度与CEA特异性CMI变化的关系。用比例风险模型的Wald检验来检验Ad5 NAb滴度与存活期的关系。所有检验均使用0.05的双侧α。

[0437] 人口统计数据:所有患者

[0438] 招募了中值年龄为58岁(范围为38-77岁)的32名转移性结肠直肠癌患者、1名肺癌患者和1名膀胱癌患者,他们经历中值为3的既往化疗方案(范围:2->5)失败,具有90%的中值功能状态(范围为70%-100%),并具有中值为3的转移性疾病部位(范围为1-5)(表2)。大多数患者能够接受所有三次免疫。在完成所有三次治疗之前停止免疫的5名患者由于显著的疾病进展而停止免疫。患者人口统计数据在表3中示出。

[0439] 表3

患者ID/队列	剂量(VP)	Dx	年龄	性别	KPS	#既往CTx	转移(部位数)	#剂量	tx后的状态	存活期(Mos)	基线	第9周的CEA
002/1	10 ⁹	C	67	M	70	>3	4	3	PD	3 (-)	98.8	867.4
003/1	10 ⁹	R	63	M	100	5	2	3	PD	9 (-)	195.1	472.2
004/1	10 ⁹	C	53	F	100	2	3	3	PD	11 (-)	65.4	196.8
005/2	10 ¹⁰	C	60	M	100	3	3	3	SD	12 (+)	2.5	3.7 (7个月)

[0441]

												随访)
007/2	10 ¹⁰	C	52	M	80	2	5	1	PD	1 (-)	120.7	未进行
008/2	10 ¹⁰	C	42	F	100	3	3	3	PD	12 (+)	3.0	3.1
010/2	10 ¹⁰	C	58	M	90	3	3	3	PD	12 (-)	7.1	5.8
011/3	10 ¹¹	R	50	M	100	5	1	3	PD	12 (+)	21.0	25.9
012/3	10 ¹¹	C	48	M	100	1	2	3	PD	12 (+)	5.8	18.4
013/3	10 ¹¹	R	62	M	100	3	2	2	PD	4 (-)	172.9	未进行
500/3	10 ¹¹	C	55	M	80	4	3	3	PD	12 (+)	3.2	11.5
015/3	10 ¹¹	C	58	F	80	3	4	3	PD	10 (-)	2.0	2.4
016/3	10 ¹¹	C	53	F	100	3	4	3	PD	6 (-)	6.1	12.7
017/3*	10 ¹¹	R	52	F	90	3	2	3	PD	3 (-)	204.8	未进行
501/II	10 ¹¹	R	54	M	90	1	1	3	PD	12 (+)	17.1	96.4
502/II	10 ¹¹	C	66	F	80	1	2	2	PD	3 (-)	2549.5	未进行
503/II	10 ¹¹	BI	73	M	70	4	5	1	PD	0.25 (-)	未进行	未进行
019/II	10 ¹¹	C	69	M	90	1	3	3	PD	12 (+)	264.3	638.0
020/II^	10 ¹¹	C	59	M	100	5	4	3	SD	12 (+)	2.2	2.2
021/II^	10 ¹¹	C	51	F	100	4	3	3	PD	12 (+)	2.0	2.7
506/II	10 ¹¹	C	77	F	80	2	2	3	PD	3 (-)	16.5	38.2
023/II	10 ¹¹	C	51	F	100	3	4	3	PD	4 (-)	32.4	211.4
504/II	10 ¹¹	C	57	M	90	3	3	3	PD	12 (+)	424.7	2073.6
507/II	10 ¹¹	R	58	M	90	2	2	3	PD	12 (+)	<0.5	0.6
508/II	10 ¹¹	L	67	M	100	2	0	3	未知	12 (+)	109.2	未进行
024/II	10 ¹¹	C	67	M	90	2	3	3	PD	12 (+)	7.8	6.4
025/II	10 ¹¹	C	62	F	100	2	4	3	PD	7 (-)	391.2	未进行
026/II	10 ¹¹	C	53	M	100	3	2	2	PD	4 (-)	4057.5	7859.1 (治疗#2)
030/5	5x10 ¹¹	C	38	M	90	4	3	3	PD	8 (+)	9.2	18.7
031/5	5x10 ¹¹	R	72	F	90	4	2	3	SD	7 (+)	3.9	5.6
032/5@	5x10 ¹¹	R	53	M	90	4	3	3	PD	6 (-)	31.9	75.4
033/5@	5x10 ¹¹	R	48	F	90	>3	2	3	PD	5 (-)	21.3	21.1
034/5	5x10 ¹¹	C	62	M	100	5	4	3	PD	6 (+)	1.9	2.4
035/5	5x10 ¹¹	C	60	F	90	3	5	2	PD	2 (-)	9.5	未进行

[0442] Dx=诊断 (B1=膀胱癌;C=结肠癌;L=肺癌;R=直肠癌);KPS=Karnofsky功能状态;*同时施用西妥昔单抗;^同时施用贝伐单抗;@同时施用帕尼单抗

[0443] ++代表免疫开始后第9周时的疾病状态

[0444] PD=疾病进展;SD=疾病稳定

[0445] (+) 存活;(-) 最后一次随访时死亡;存活期四舍五入到最近的月份

[0446] 人口统计数据:结肠直肠腺癌患者

[0447] 招募了中值年龄57.5 (范围为38-77)、患有转移性结肠直肠癌的32名患者,他们经历中值为3的既往化疗方案 (范围:2->5) 失败,具有90%的中值功能状态 (范围为70%-100%),并具有中值为3的转移性疾病部位 (范围为1-5) (表2)。大多数患者能够接受所有三次免疫。早期停止免疫的4名患者由于显著的疾病进展而停止免疫。结肠直肠腺癌患者人口统计数据与先前公布的化疗难治性结肠直肠癌患者的研究有利地进行了比较。

[0448] 不良反应

[0449] 向所有患者施用总计94例免疫治疗。没有发生导致任何疫苗剂量水平下治疗中止的剂量限制性毒性和严重不良事件。最常见的毒性 (表3) 是自限性注射部位反应。以低频率

发生的其他反应包括发热、流感样症状、厌食、寒颤、恶心和头痛。这些症状也是自限性的，除对症治疗措施如对乙酰氨基酚外，无需干预。

[0450] 治疗之前和之后的血液学、化学和ANA数值概述

[0451] 通过记录病例记录形式 (CRF) 的个体患者的血液血液学、化学和抗核抗体 (ANA) 数值来监测Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 注射的生物学效应。在进入试验的全部34名患者中, 28名接受采用Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 进行的所有三次治疗。对于接受所有三次治疗的28名患者, 将第0周 (第一次治疗前) 时与第9周 (第三次治疗后三周) 时获得的血液血液学、化学和ANA数值进行比较。如下表4中所示, 用Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 治疗后, 在化学或ANA数值方面没有显著变化。在血液血液学数值方面仅存在一个显著变化。治疗后第9周时的嗜碱性粒细胞计数显著 ($P=0.0403$) 降低。然而, 该值仍保持在嗜碱性粒细胞计数的正常范围内, 并且总体上没有显著的生物学效应。

[0452] 临床结果

[0453] 评估患者在基线时和第9周时的CEA水平。在基线时和随访时具有可获得的CEA水平的患者中, 3名 (患者010、020和024) 在免疫期结束时CEA水平没有增加, 而其余患者显示出增加的CEA水平。3名患者具有稳定的疾病, 他们在9周的研究期间仍保持疾病稳定。所有其他患者都经历一定水平的疾病进展 (表2)。在队列1和队列2中的7名患者中, 5名患者死亡, 而2名患者在免疫开始后12个月时仍然存活。在队列3和II期中的21名患者中, 分别有10名患者死亡, 而所有其余11名患者均在第12个月时仍然存活。在队列5中的6名患者中, 分别有3名患者死亡, 3名患者在第6、7和8个月时存活。

[0454] 在参与研究的34名患者中, 2名患者接受了一次治疗, 4名患者接受了两次免疫治疗, 而其余28名患者接受了所有三次免疫治疗。追踪所有患者的存活, 并完成Kaplan-Meier图和存活率 (PRISM软件)。通过从社会保障死亡指数 (SSDI) 数据库和临床图表收集的信息来确定患者死亡。

[0455] 队列1和队列2中的7名患者经历了29%的12个月存活率 (图12A)。在队列1和队列2的患者中, 患者004存活11个月, 并接受用贝伐单抗、奥沙利铂和希罗达进行的额外的免疫后治疗。患者003存活9个月, 并在Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 免疫后接受辐射治疗。患者005在12+个月时存活, 接受辐射治疗并在免疫后进入另一项临床试验。患者010存活长达12个月, 并在免疫后进入两项临床试验。患者002、007和008在免疫后不接受进一步的治疗, 并且分别存活3个月、1个月和12+个月。

[0456] 队列3和II期的21名患者经历了48%的12个月存活率 (图12B)。在队列3和II期的患者中, 1名患者 (017) 在免疫期间同时接受西妥昔单抗。患者020和021在免疫期间同时接受贝伐单抗。患者011存活超过12个月, 并在Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 免疫后接受放疗。患者012和016分别存活超过12个月和6个月, 并在免疫后接受额外的化疗。患者013存活4个月, 并在免疫后接受采用多吉美的治疗。患者015存活10个月, 并接受采用西妥昔单抗的后续治疗。患者019存活超过12个月, 并在拟定的免疫后接受采用贝伐单抗和xeliri的治疗。患者020存活超过12个月, 并在免疫后接受采用贝伐单抗的治疗。患者021存活超过12个月, 并接受采用贝伐单抗和希罗达的后续治疗。患者500存活超过12个月, 并在免疫后接受采用西妥昔单抗和希罗达的治疗并进入临床试验。患者501存活超过12个月, 并在Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 免疫后接受采用西妥昔单抗和伊立替康的治疗。患者508已存活超过12个月; 然而,

无法获得关于该患者特征的进一步数据。患者017、023、024、025、026、502、504、506和507在免疫后没有接受进一步治疗,并且分别存活3个月、4个月、12+个月、7个月、4个月、3个月、12+个月、3个月和12+个月(+表示在撰写时仍然存活)。

[0457] 队列5中的6名患者经历了50%的12个月存活率(图12C)。在该队列的患者中,1名患者(030)目前在8个月时存活,并在Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)免疫后接受帕唑帕尼治疗和阈值302化疗。患者031目前在7个月时存活,并且在免疫后没有接受进一步治疗。患者032同时接受帕尼单抗,存活6个月,并在免疫后接受采用奥沙利铂的治疗。患者033同时接受帕尼单抗,存活5个月,在免疫后没有额外治疗。患者034目前在6+个月时存活,并且在免疫后接受放疗和采用希罗达的治疗。患者035接受两次治疗并存活2个月。

[0458] 对于7.4个月的中值存活期,所有34名患者作为一组(队列1、2、3/II期和队列5)经历了41%的12个月存活率(图12D)。在进入研究的34名患者中,28名患者接受了3次免疫治疗并经历了55%的12个月存活率(图13A),并且具有10.625个月的中值存活期。对于结肠直肠癌患者,27名患者接受了3次免疫治疗并经历了53%的12个月存活率(图13B),并且具有10.00个月的中值存活期。

[0459] 经治疗的转移性结肠直肠癌患者中免疫参数的评估

[0460] 第二个目的是评估用产品进行免疫治疗后的CEA特异性免疫应答。

[0461] 从采用PSA-TRICOM疫苗与ipilimumab组合的临床试验中所招募的前列腺癌患者(HLA-A2⁺和HLA-A24⁺)的外周血单核细胞(PBMC)生成树突细胞;使用来自该患者接种疫苗后的PBMC,无法建立对CEA、MUC1和brachyury具有特异性的个体T细胞系。简言之,使用淋巴细胞分离培养基梯度分离PBMC,将PBMC重悬于AIM-V培养基(2×10^7 个细胞)中,并使其在6孔板中贴壁2小时。在含有100ng/ml重组人(rh)GM-CSF和20ng/ml rhIL-4的AIM-V培养基中将贴壁细胞培养5天。每3天补充一次培养基。

[0462] 如通过ELISA所测定的,没有观察到针对CEA的抗体活性。对队列1、队列2、队列3/II期和队列5中治疗的结肠直肠癌患者中的CMI应答进行了评估。在Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)治疗之前和所有治疗之后以及最后一次治疗后三周从患者分离PBMC。对PBMC进行CEA特异性ELISpot测定,以确定在体外暴露于CEA肽之后分泌干扰素 γ (IFN- γ)的淋巴细胞的数量。测定免疫期间最高的CMI应答,不论在队列1、队列2、队列3/II期和队列5中治疗的时间点(第3、6或9周)如何。该分析显示了对增加水平的产品的剂量反应。最高的CMI水平发生在接受 5×10^{11} 个VP的最高剂量的患者中(队列5)(图14)。

[0463] 诱导的对CEA的CMI应答的测定

[0464] 对每次免疫之前和最终免疫完成之后取出的冷冻保存的PBMC样品进行ELISpot分析,以评估CEA特异性CMI应答。观察到在接受最高剂量Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)的患者中发生的具有最高量级的CEA特异性CMI应答的剂量反应效应(图14)。在所接受的剂量中,队列1中的0/3(0%)的患者显示出阳性CEA导向的CMI应答,队列2中的1/4(25%)的患者显示出阳性CEA导向的CMI应答,队列3/II期中的10/19(53%)的患者显示出阳性CEA导向的CMI应答,以及队列5中的4/6(67%)的患者显示出阳性CEA导向的CMI应答。CEA特异性CMI诱导的时程(图15)表明,在最后一次剂量之前CEA CMI的量级可能存在稳定期。在接受相同剂量的最大组患者(队列3加II期)中,观察到在第6周评估时平均CEA导向的CMI应答比基线时显著增加($P < 0.05$, Mann-Whitney检验),取平均值94个SFC/106个PBMC,并且到第9周评估时进一步增

加(图15)。一名患者(患者ID 13)具有高度升高的基线CEA特异性免疫应答(1100SFC),并且在第6周时具有升高的CMI(2305个SFC),但没有返回进行第9周评估,因此未被包含在CEA CMI分析中。

[0465] 还对针对Ad5的Ad5 NAb和CMI进行了测量,并将其与CEA特异性CMI关联起来。在基线时(治疗之前)和在3次治疗完成后第9周时对每名患者的血清和PBMC样品进行了测试。在该研究中测试的31名结肠直肠癌患者中的19名(61%)在用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)治疗开始前的血清样品中具有Ad5中和活性。在所有患者中获得的平均预先治疗Ad5 NAb滴度值为 $1:189 \pm 1:71$ SEM(几何平均值 $1:21$),而血清阳性患者的平均预先治疗Ad5 NAb滴度为 $1:308 \pm 1:108$ (几何平均值 $1:146$)。来自接受3次免疫的患者的血清样品分析显示,与患者各自的基线值相比,到第9周时Ad5 NAb滴度显著增加($P < 0.0001$,Mann-Whitney检验)(平均值 $1:4767 \pm 1:1225$ SEM(几何平均值 $1:1541$))(图16)。PBMC的对Ad5的CMI应答分析还显示出用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)免疫后Ad5导向的CMI应答的显著增加($P < 0.01$,Mann-Whitney检验)(图16)。

[0466] 来自具有低基线预先存在的Ad5免疫力(Ad5 NAb ≥ 200)的患者与具有高基线Ad5免疫力(Ad5 NAb > 200)的患者的第9周CEA导向的CMI应答的比较显示,在免疫应答方面无显著差异($P > 0.4$,Mann Whitney检验)(图17)。此外,当比较最高的CEA特异性CMI应答与预先存在的或载体诱导的Ad5 NAb活性时,CEA CMI与Ad5 NAb活性水平之间无相关性(图17)。这些数据表明,尽管存在预先存在的和/或免疫诱导的Ad5免疫力,但用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)进行免疫不仅能够克服自身耐受性,而且还能在结肠直肠癌患者中诱导CEA特异性免疫应答。这些临床试验数据一起支持向以总存活期作为主要终点的III期临床试验推进。

[0467] 不良反应、血液学、化学和ANA值

[0468] 在该I/II期试验中,证明Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)适合规模生产,并且适合通过常规皮下注射技术容易且重复地施用。最常见的不良反应是注射部位反应和由发热、寒颤、头痛和恶心组成的流感样症状。对血液血液学或血清化学没有影响,并且总体而言,治疗耐受性良好。具体而言,没有注意到SAE,并且没有治疗由于不良事件而停止,表明在该临床应用中还未达到Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)使用的剂量限制。

[0469] 这些数据表明,用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)进行治疗的晚期结肠直肠癌患者没有严重的不良反应,并且即使他们具有对Ad5的预先存在的免疫力,也可经历寿命延长。该试验的结果足以鼓舞人心以向大型、随机化、单一药剂试验推进。一些患者经历了剂量依赖性的CMI增加的观察结果表明,CMI的增加可能在其临床结果中发挥作用。

[0470] 表4.不良事件

[0471]

不良事件	事件数	不相关/ 不可能的	可能的	很可能/ 确定的	*级别	**%发生率
注射部位反应	21			21	G1 (19); G2 (2)	22.3
疼痛(所有类型)	17	17			G1 (8); G2 (7); G3 (2)	18.1
发热	10	4	2	4	G1 (7); G2 (3)	10.6
流感样症状	10	3	5	2	G1 (9); G2 (1)	10.6
疲劳	8	6	2		G1 (5); G2 (2); G3 (1)	8.5
呼吸短促	6	6			G1 (3); G2 (3)	6.4
厌食	5	4	1		G1 (3); G2 (2)	5.3
寒颤	5	1	1	3	G1 (5)	5.3
恶心	5	4	1		G1 (5)	5.3
便秘	5	5			G1 (3); G2 (2)	5.3
水肿	5	5			G1 (3); G2 (2)	5.3
呕吐	4	4			G1 (4)	4.3
高血压	3	3			G1 (2); G2 (1)	3.2
贫血	3	3			G1 (1); G2 (1); G3 (1)	3.2
咳嗽	2	2			G1 (2)	2.1
抑郁	2	2			G1 (2)	2.1
腹泻	2	2			G1 (2)	2.1
头疼	2	1	1		G1 (2)	2.1
低白蛋白血症	2	2			G1 (1); G2 (1)	2.1
低钾血症	2	2			G1 (1); G2 (1)	2.1
胸腔积液	2	2			G2 (1); G3 (1)	2.1
碱性磷酸酶增加	2	2			G1 (1); G3 (1)	2.1
肌痛	2		2		G1 (2)	2.1
盗汗	2	2			G1 (1); G2 (1)	2.1
嗜睡	2	2			G1 (2)	2.1
低镁	2	2			G1 (2)	2.1
腹胀	1	1			G1 (1)	1.1
腹部膨胀	1	1			G3 (1)	1.1

[0472]

不良事件	事件数	不相关/ 不可能的	可能的	很可能/ 确定的	*级别	**%发生率
腹部肿胀	1	1			G2 (1)	1.1
腹部损伤	1	1			G2 (1)	1.1
ALT 增加	1	1			G1 (1)	1.1
AST 增加	1	1			G2 (1)	1.1
胆道阻塞	1	1			G3 (1)	1.1
肠道阻塞	1	1			G3 (1)	1.1
感冒	1	1			G1 (1)	1.1
呼吸困难	1	1			G3 (1)	1.1
排尿困难	1	1			G1 (1)	1.1
尿频	1	1			G1 (1)	1.1
胃肠失调	1	1			G3 (1)	1.1
锥体外系运动	1	1			G1 (1)	1.1
失眠	1	1			G1 (1)	1.1
单纯疱疹	1	1			G1 (1)	1.1
低血压	1	1			G1 (1)	1.1
食欲不振	1	1			G1 (1)	1.1
低白细胞	1	1			G1 (1)	1.1
指尖麻木/感觉	1	1			G1 (1)	1.1
初潮	1	1			G1 (1)	1.1
睡眠质量差	1	1			G1 (1)	1.1
先兆昏厥	1	1			G2 (1)	1.1
瘙痒	1	1			G1 (1)	1.1
右下眼睑皮疹	1	1			G1 (1)	1.1
右上眼睑红肿/肿胀	1	1			G1 (1)	1.1
肾结石	1	1			G2 (1)	1.1
流鼻涕	1		1		G1 (1)	1.1
浅呼吸	1	1			G1 (1)	1.1
肌肤皮疹	1	1			G1 (1)	1.1
阴道溢液	1	1			G1 (1)	1.1
注意力集中 (Concentration)	1				G1 (1)	1.1
体重减轻	1	1			G2 (1)	1.1
关节炎关节炎	1	1			G1 (1)	1.1
面红	1		1		G1 (1)	1.1
急性肾功能衰竭	疾病 进展				G3 (1)	1.1

[0473] *括号()表示事件数目。

[0474] **基于94次治疗

[0475] 表5. 血液学、化学和ANA值

[0476]

血液学测试	第 0 周值(平均值±SEM)	第 9 周值(平均值±SEM)
Hgb (g/dL)	13.09 ± 0.313	12.48 ± 0.413
Hct (%)	39.63 ± 0.875	37.92 ± 1.140
Plt (x10 ⁹ /L)	225.1 ± 20.76	247.3 ± 23.57
WBC (x10 ³ /mm ³)	6.81 ± 0.532	8.21 ± 0.741
嗜中性粒细胞(%)	64.46 ± 2.068	67.28 ± 3.268
淋巴细胞(%)	23.23 ± 1.874	18.34 ± 2.071
单核细胞(%)	8.86 ± 0.462	7.68 ± 0.569
嗜酸性粒细胞(%)	3.97 ± 0.677	3.16 ± 0.685
嗜碱性粒细胞(%)	0.52 ± 0.056	0.38 ± 0.048
化学测试	第 0 周值(平均值±SEM)	第 9 周值(平均值±SEM)
Na (mEq/L)	139.2 ± 0.424	137.9 ± 0.718
K (mEq/L)	3.90 ± 0.085	3.80 ± 0.073
Cl (mEq/L)	105.0 ± 0.561	103.3 ± 1.061
CO ₂ (mEq/L)	27.8 ± 0.374	27.63 ± 0.458
BUN (mg/dL)	17.0 ± 1.136	17.1 ± 1.611
肌酐(mg/dL)	0.81 ± 0.046	0.86 ± 0.054
葡萄糖(mg/dL)	121.8 ± 7.458	123.5 ± 7.885
Ca (mg/dL)	8.84 ± 0.075	8.87 ± 0.073
总蛋白(g/dL)	6.95 ± 0.078	6.67 ± 0.100
白蛋白(g/dL)	3.78 ± 0.085	3.62 ± 0.113
AST (U/L)	31.71 ± 3.846	31.88 ± 3.506
ALT (U/L)	27.83 ± 4.228	25.67 ± 3.414
碱性磷酸酶(U/L)	107.0 ± 13.30	124.0 ± 17.40
胆红素(mg/dL)	0.78 ± 0.071	0.75 ± 0.079
*ANA 测试	第 0 周值(平均值±SEM)	第 9 周值(平均值±SEM)
滴度	103.3 ± 51.04	123.3 ± 50.56

[0477] *值代表滴度的倒数,并且来自具有正值的患者。

[0478] 讨论

[0479] 通常,腺病毒载体由于其诱导特异性针对转基因产物的稳定的适应性免疫应答的倾向而具有用作癌症治疗疫苗的巨大潜力。然而,在同源的初次/加强方案中使用的重组第一代Ad5[E1-]载体由于预先存在的Ad5免疫力以及载体诱导的免疫力的存在而使其潜在功效受到极大的限制。具体而言,Ad5导向的免疫力减轻了对已被并入早期一代基于Ad5[E1-]的平台中的对TAA的免疫应答。本研究使用的Ad5[E1-,E2b-]平台旨在通过避免呈现作为预先存在的Ad5免疫的靶标的抗原来调整同源的初次-加强方案。由于CEA已被美国国家癌症研究所确定为优先的癌症抗原之一,因此将该TAA作为将被并入用作癌症治疗疫苗的新型Ad5[E1-,E2b-]载体平台中的转基因进行研究。成年人中的CEA表达通常限于胃肠道上皮的低水平,而CEA在结肠和直肠腺癌以及在许多乳腺癌、肺癌和胰腺癌中过表达。由于与野生型CAP1表位相比,CAP1(6D)可增强CTL的致敏性,并且已被包含在最近的基于CEA的疫苗构建体中,因此选择了CEA的HLA A2限制性CAP1(6D)修饰。尽管由于使用了不受HLA限制的全长CEA而没有对HLA类型进行测试,但A*0201是白种人中最频繁观察到的等位基因(等位基因频率0.2717),并且在其他群体中是常见的。然而,对患者的HLA类型进行测试并利用HLA类型与临床和/或CMI应答之间的关系是可能的。

[0480] 在表达CEA的癌症的临床前鼠模型中测试了采用表达TAA CEA的这类Ad5疫苗(Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D))的单剂量水平(1×10^{10} 个VP)的三次施用进行的多次皮下免疫。在具有

预先存在的Ad5免疫力的小鼠中证明,有效的CEA导向的CMI应答的诱导产生抗肿瘤活性,并注意到这些CMI和抗肿瘤应答显著强于由当前一代基于Ad5[E1-]的载体疫苗所诱导的那些应答。在其他动物模型(靶向癌症和感染性疾病)中证明,用基于新型Ad5[E1-,E2b-]平台的疫苗进行多次皮下免疫诱导优于当前一代基于Ad5[E1-]的疫苗所诱导的CMI应答的CMI应答,可克服Ad5免疫力的屏障,并且可用于需要产生稳定的CMI应答的多种免疫方案中。CEA导向的CMI应答的最大量级发生在接受最高剂量载体的患者中。尽管存在预先存在的和/或载体诱导的Ad5免疫力,但仍以剂量反应性方式诱导CEA导向的CMI应答。采用ELISA技术在疫苗接种前或接种后均未观察到CEA导向的抗体反应。还在免疫之后观察到多功能性CD8+T细胞(当被激活时分泌多于一种细胞因子的细胞)的群体,这是疫苗诱导的T细胞更强功能性的征兆。这些数据支持在被设计用于在晚期结肠直肠癌患者中诱导并增加CEA导向的CMI应答的同源初次-加强方案以及任何数目的其他疫苗适用疾病或应用中使用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)载体。

[0481] 与在早期1(E1)基因区域中含有缺失的早期一代Ad5[E1-]载体相比,在早期2b(E2b)基因区域中具有额外缺失的Ad5[E1-,E2b-]载体平台显示出显著降低的针对载体的炎症反应。这可导致更长的转基因表达并导致减少由于诱导的炎症反应而将另外发生的表达转基因的细胞(例如,抗原呈递细胞)的消除。由于Ad5晚期基因抗原表达与早期一代Ad5平台相比显著降低,因此可使Ad5[E1-,E2b-]平台能够在显著更长的时间段逃避Ad5免疫介导的中和活性,从而导致更长的寿命和TAA表达的扩增。此外,E2b基因产物,即聚合酶,是针对Ad5感染的人类细胞记忆免疫应答的靶标,并且该E2b基因产物从疫苗中的消除可增强其在预先存在的Ad5免疫力环境中的能力。不受理论的约束,在该环境中通过载体获得的TAA的扩增和/或更高表达可导致针对靶抗原的更有效的免疫应答。然而,这种载体构型也可能产生更佳的转基因表达、不同的生物分布或影响该载体有效性的不同的先天性/适应性免疫效应,而不是逃避预先存在的免疫力。

[0482] 感兴趣的是在本研究中治疗的患者显示出良好的生存概率这一观察结果。总体而言,用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)治疗至少2次的所有25名患者显示出48%的12个月生存概率,并且尽管存在显著水平的预先存在的Ad5中和抗体滴度,但仍达到该生存概率。不受理论的约束,通过参与患者的免疫系统,主动免疫治疗剂如Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)可在长时间内诱导持续的免疫抗肿瘤反应,这可导致不是通过标准反应评估来测量的肿瘤快速生长速度或扩散的特定方面的“减速”或变化。实际上,观察到携带已建立的表达CEA的肿瘤的Ad5免疫小鼠在用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)治疗后的较慢的肿瘤进展。此外,已经注意到,总存活期可能是用于确定任何潜在的癌症(免疫)治疗的临床功效的唯一真实参数。

[0483] 实施例5:转移性结肠直肠癌中CEA(6D)免疫治疗剂的临床研究

[0484] 在mCRC中使用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)的I/II期临床试验:这项首次在男性中进行的I/II期给药试验的目的在于评价安全性、评估mCRC患者中的CEA特异性免疫应答,并获得有关总存活期的数据。根据FDA批准的IND14325进行该试验,并在ClinicalTrials.gov(NCT01147965)上注册。每3周皮下(sc)施用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)剂量,进行3次治疗,如下:队列1(3名患者)每次治疗接受 10^9 个VP;队列2(3名患者)接受 10^{10} 个VP;队列3/4(21名患者)接受 10^{11} 个VP;以及队列5(5名患者)接受 5×10^{11} 个VP。

[0485] 患者人口统计数据:

[0486] 32名患有表达CEA的癌症的mCRC患者被招募进入该研究中。招募的32名mCRC患者具有中值年龄57.5 (范围为38-77), 经历中值为3的既往化疗方案 (范围: 2-5) 失败, 具有90%的中值功能状态 (范围为70%-100%), 并具有中值为3的转移性疾病部位 (范围为1-5)。大多数患者接受了所有三次免疫。早期停止免疫的患者由于显著的疾病进展而停止免疫。mCRC人口统计数据与先前公布的化疗难治性mCRC的研究有利地进行了比较。

[0487] 不良反应:

[0488] 没有发生导致任何剂量水平下治疗中止的剂量限制性毒性和严重不良事件。最常见的毒性是自限性注射部位反应。将第0周时 (第一次治疗前) 的血液血液学、化学和抗核抗体 (ANA) 值与第9周时获得的值进行比较。在化学、血液学或ANA值方面没有生物学上相关的变化。

[0489] 临床结果:

[0490] 在免疫治疗前, 对患者进行抗癌治疗清除30天。Kras野生型和突变的患者均被招募。

[0491] 追踪mCRC患者的长期生存, 并完成Kaplan-Meier生存图 (PRISM软件)。从社会保障死亡指数数据库和临床图表确定事件。中值总存活期为11个月, 并且18个月时的总存活率为30%, 并且29个月时为20% (图18)。

[0492] 免疫应答:

[0493] 第二个目的是评估免疫治疗期间的CEA特异性免疫应答。此外, 由于mCRC患者代表最高数目的治疗患者, 因此对其进行免疫原性研究。如通过ELISA所测定的, 在血清样品中没有针对CEA的可检测的抗体活性。

[0494] 评估所有队列中治疗的mCRC患者的CMI应答。在每次免疫治疗之前和之后以及最后一次治疗后三周, 从患者分离外周血单核细胞 (PBMC)。如前所述对PBMC进行CEA特异性ELISpot测定, 以确定在暴露于CEA肽之后分泌IFN- γ 的细胞 (SFC) 的数目。确定免疫期间最高的CMI应答, 不论时间点 (第3、6或9周) 如何。该分析显示出随着疫苗水平增加的剂量-反应关系 (图19); 最高的CMI水平发生在接受 5×10^{11} 个VP的最高剂量 (队列5) 的患者中, 并且尽管在大多数 (61%) 患者中存在预先存在的Ad5免疫力, 但仍观察到应答。随时间推移的连续PBMC样品的分析表明, CEA导向的CMI应答在3次免疫过程中得以诱导并增强 (图20)。

[0495] 简言之, 在基线时 (前) 和在Ad5[E1-, E2b-]-CEA (6D) 施用之后 (后), 对CMI (IFN- γ 分泌) 进行评估。在治疗后的患者中观察到的最高CMI应答 (不论时间点如何) 显示出剂量反应。最高的CMI水平发生在接受最高剂量的患者 (队列5) 中, 并且显著升高 ($P < 0.02$; Mann-Whitney检验)。通过与不相关抗原 β -半乳糖苷酶和HIV-gag的反应性的缺乏来证明应答的特异性。对于阳性对照, PBMC暴露于伴刀豆球蛋白A。数值=平均值 $\pm$ SEM (图19)。

[0496] 简言之, 在第0、3、6和9周对免疫的mCRC患者中的CMI (ELISpot IFN- γ SFC) 应答进行评估。注意免疫期间CMI应答的增加。数值=平均值 $\pm$ SEM (图20)。

[0497] 使用流式细胞术对治疗的mCRC患者进行的其他免疫分析

[0498] 在暴露于CEA肽后, 对来自具有高CMI活性 (>1000 ELISpot IFN- γ SFC) 的患者的PBMC的流式细胞术检测显示出CD8+/IFN- γ +细胞 (3.5%)、CD8+/IFN- γ + /TNF- α +细胞 (1.0%)、CD4+/IFN- γ +细胞 (0.4%) 和CD4+/IFN- γ + /TNF- α +细胞 (0.2%), 从而证明了多功能细胞存在。

[0499] 还通过流式细胞术对患者PBMC样品的HLA-A2阳性进行了测试,并且所测试的63%的样品为HLA-A2阳性。当与HLA-A2的存在相关联地评估每名患者达到的最高CMI应答水平时,在HLA-A2+与HLA-A2-患者之间没有观察到显著差异(264.6 ± 119.0 IFN- γ SFC与 165.6 ± 108.1 IFN- γ SFC)。

[0500] 为了评估对溶细胞性T淋巴细胞(CTL)应答的诱导,进行针对粒酶B活性的ELISpot测定。粒酶B是经由颗粒介导途径的靶细胞死亡的关键介质,并且效应物-靶标相互作用后由溶细胞性淋巴细胞释放的粒酶B是CTL的指示物。粒酶B ELISpot测定是比 ^{51}Cr -释放测定更优的替代方案,因为它明显更灵敏,并提供对细胞毒性效应细胞频率的估计。

[0501] 在免疫后观察到PBMC的增强的粒酶B活性(图16)。重要的是,在对来自5名mCRC患者的PBMC样品的延长的随访中,被观察到在免疫后降低(图22)的CMI应答停止,表明可能需要进一步的“加强”免疫来维持诱导的CEA导向的CMI活性。

[0502] 简言之,在治疗之前(第0周)和之后(第6-9周)对CTL应答(ELISpot分泌粒酶B的SFC)进行评估。免疫后应答增加($P < 0.05$)。数值=平均值 $\pm$ SEM(图21)。

[0503] 简言之,通过ELISpot IFN- γ SFC来评估来自5名患者的PBMC样品。CMI应答在第9周时达到峰值,并且到治疗停止后第26周降低(图22)。

[0504] 这些数据表明,尽管有预先存在的Ad5中和活性,但用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)进行的多次同源免疫仍在患者中诱导CEA特异性CMI免疫应答。这些数据进一步表明,重要的是,观察到最小的毒性和有利的总生存曲线。最后,结果表明,新型Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)基因递送/表达平台可克服对TAA的耐受性,并在天然获得的Ad5特异性免疫力的环境中产生对CEA的显著CMI应答。

[0505] 实施例6:临床级多靶向疫苗的GLP生产

[0506] 该实施例示出了使用良好实验室规范(GLP)标准的临床级多靶向疫苗的生产。先前,根据良好生产规范标准,在GLP条件下使用5L细胞生物反应器生产Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)产品。该实施例显示,可使用类似的方法在5L细胞生物反应器中生产Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C和Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury产品。

[0507] 简言之,将小瓶的E.C7生产细胞系解冻,转移到T225烧瓶中,并在含有10%FBS/4mM L-谷氨酰胺的DMEM中,在37°C下、5%CO₂中进行初始培养。扩增后,将使用10层的CellSTACKS(CS-10)扩增E.C7细胞,并将其转移到FreeStyle无血清培养基(SFM)中。在细胞生物反应器中,在37°C下、5%CO₂中将E.C7细胞在SFM中培养24小时,达到 5×10^5 个细胞/mL的目标密度。然后将分别用Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C或Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury感染E.C7细胞,并将该细胞培养48小时。

[0508] 将根据IND14325以与用来制备临床级Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)产品相同的方式进行中流处理。在收获前30分钟,将向培养物中加入Benzonase核酸酶以促进更好的细胞沉淀以进行浓缩。通过离心而沉淀后,将弃去上清液,并将沉淀在室温下重悬于含有1%聚山梨醇酯-20的裂解缓冲液中90分钟。然后将用Benzonase处理裂解物,并通过加入5M NaCl而使反应猝灭。将浆液离心并弃去沉淀。将通过过滤使裂解物变澄清并使裂解物经历双柱离子交换程序。

[0509] 为了纯化疫苗产物,将进行双柱阴离子交换程序。将用QSepharose XL树脂填充第一柱,将该柱消毒,并用加载缓冲液进行平衡。将澄清的裂解物加载到柱上并用加载缓冲液

洗涤。将洗脱疫苗产物,并将含有Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C或Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury的主要洗脱峰(洗出液)转移到下一步。将用Source 15Q树脂填充第二柱,将该柱消毒,并用加载缓冲液进行平衡。将来自第一阴离子交换柱的洗出液加载到第二柱上,并用开始为100%缓冲液A(20mM Tris,1mM MgCl₂,pH 8.0),然后转变为50%缓冲液B(20mM Tris,1mM MgCl₂,2M NaCl,pH 8.0)的梯度洗脱疫苗产物。将收集含有Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C或Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury的洗脱峰,并在2-8℃下储存过夜。将通过用于对制剂缓冲液(20mM Tris,25mM NaCl,2.5% (v/v) 甘油,pH 8.0)进行浓缩和渗滤的切向流过滤(TFF)系统处理峰洗脱级分。处理后,将对最终的疫苗产物进行无菌过滤,分装成等分试样,并在≤-60℃下储存。通常产生接近100%纯度的高纯度产物,并对这些产物的相似结果进行预测。

[0510] 将通过分光光度法测定产生的VP产物的浓度和总数目。通过HPLC评估产物纯度。通过使用试剂盒对感染性颗粒进行Ad5六邻体染色测定来确定感染活性。

[0511] 将使用来自载体转染的A549细胞的裂解物进行蛋白质印迹,以验证mMUC1-C或Brachyury表达。将进行质量控制测试,以确定最终的疫苗产物无支原体,没有微生物生物负载,并显示出小于2.5内毒素单位(EU)/mL的内毒素水平。为了确认免疫原性,将如下所述(实施例7)在小鼠中测试单个载体。

[0512] 实施例7:多靶向CEA、MUC1、T病毒载体的免疫原性

[0513] 该实施例示出了使用针对CEA、MUC1和T(Brachyury)的多靶向疫苗的免疫原性结果。如本文所述测试每种病毒载体产物的纯度、感染性和抗原表达,并且每种均通过这些标准。

[0514] 疫苗接种和脾细胞制备

[0515] 用10¹⁰VP的Ad5[E1-,E2b-]-brachyury或Ad5[E1-,E2b-]-CEA或Ad5[E1-,E2b-]-MUC1,或者1:1:1比例的10¹⁰VP的所有三种病毒的组合(Tri-Ad5)皮下注射雌性C57BL/6小鼠(n=5)。用3x10¹⁰VP的Ad-空壳(无转基因插入片段)注射对照小鼠。在25μl注射缓冲液(具有3%蔗糖的20mM HEPES)中施用剂量,并以14天的间隔对小鼠进行三次疫苗接种。在最后一次注射后14天收集脾和血清。将血清在-20℃下冷冻。通过经由70μm尼龙细胞过滤器(BD Falcon, San Jose, CA)轻柔地破碎脾而生成脾细胞悬浮液。通过添加红细胞裂解缓冲液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)去除红细胞,并将脾细胞洗涤两次并重悬于R10(补充有L-谷氨酰胺(2mM)、HEPES(20mM)、青霉素100U/ml和链霉素100μg/ml,以及10%胎牛血清的RPMI 1640)中。通过ELISPOT和流式细胞术测定脾细胞的细胞因子产生。

[0516] 免疫原性研究:

[0517] 先前的研究评估了由多靶向疫苗混合物产生的诱导免疫力。采用Ad5[E1-,E2b-]载体的免疫是剂量依赖性的,并且常规使用1x10¹⁰个VP/剂量。使用C57BL/6小鼠组(N=5)。

[0518] 该研究用包含具有Ad5[E1-,E2b-]-空壳的3x10¹⁰个病毒颗粒(VP)(空载体对照)的三次免疫或用含有Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)、Ad5[E1-,E2b-]-mMUC1-C和Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury的1:1:1混合物的3x10¹⁰个VP以2周的间隔对C57BL/6小鼠进行3次皮下注射。

[0519] 如(8-12,14)所述,最后一次免疫后两周,在脾细胞分别暴露于CEA、MUC1或Brachyury肽库之后,采用针对分泌IFN-γ的细胞(SFC)的ELISpot测定来确定CMI活性。

[0520] 在免疫小鼠中检测到显著的CMI应答(图23)。在暴露于CEA肽后,对脾细胞进行利用细胞内细胞因子染色的流式细胞术,以评估活化的CD4+和CD8+T细胞的数量。

[0521] 简言之,在多靶向免疫小鼠而非对照小鼠(注射有Ad5-空壳空载体)中,检测到如通过针对分泌IFN- γ 的脾细胞(SFC)的ELISpot测定所评估的对CEA、MUC1和Brachyury的CMI应答。通过对不相关SIV-nef或SIV-vif肽抗原的反应性的缺乏来确认ELISpot测定反应的特异性。阳性对照包括暴露于伴刀豆球蛋白A(Con A,数据未示出)的细胞。数值=平均值 $\pm$ SEM(图23)。

[0522] ELISpot测定

[0523] 如上所述,通过来自新鲜分离的小鼠脾细胞的ELISpot测定来确定Brachyury-、CEA-和MUC1-特异性的分泌IFN- γ 或IL-2的T细胞。简言之,用0.2 μ g/孔的衍生自brachyury或CEA或MUC1的单个库中的重叠15-mer肽刺激 2×10^5 个脾细胞。用浓度为0.0625 μ g/孔的Con A作为阳性对照刺激细胞,并将衍生自SIV-Nef和SIV-Vif的重叠15-mer完整肽库用作不相关的肽对照。使用Immunospot ELISpot板读数器确定SFC的数目,并将结果报告为每 10^6 个脾细胞的SFC数目。

[0524] 在免疫的脾细胞中检测到表达TNF- α 和IFN- γ 的多功能CD4⁺和CD8⁺细胞(图24),但在对照脾细胞中未检测到。还使用先前描述的定量ELISA测定用纯化的CEA蛋白对血清进行测试以检测诱导的CEA抗体。在用多靶向疫苗免疫的小鼠(右)中检测到表达IFN- γ 和TNF- α 的多功能CD8⁺(顶部)和CD4⁺(底部)细胞,但在注射有Ad5-空壳的对照(左)中未检测到。通过对单独培养基或者不相关SIV-nef或SIV-vif肽的反应性的缺乏来确认反应的特异性。数值=平均值 $\pm$ SEM(图24)。

[0525] 在免疫的小鼠中检测到对CEA的显著抗体应答,但在对照小鼠中未检测到(图8)。为了确定补体依赖性细胞毒性(CDCC)的水平,使用鼠MC38-CEA靶细胞进行CDCC测试。在免疫的血清中检测到显著的CDCC活性,但在对照小鼠(注射有Ad5-空壳)中未检测到(图25)。在用多靶向疫苗免疫的小鼠中诱导了显著的($P < 0.0001$) CEA抗体(左)和CDCC(右)应答,但在对照小鼠中未诱导。数值=平均值 $\pm$ SEM(图25)。

[0526] 细胞内细胞因子刺激

[0527] 如上文所指示的制备脾细胞。在96孔U底板中使用每个孔 1×10^6 个活脾细胞进行刺激测定。合成跨越brachyury、CEA和MUC1的整个编码序列的重叠肽库作为具有11个氨基酸重叠的15-mer,并将冻干的肽库溶解于DMSO中。将对应于SIV-Vif和SIV-Nef的类似构建的肽库用作离靶(off-target)对照。通过以2 μ g/mL/肽添加肽库并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下温育6h,并向该温育物中添加蛋白质转运抑制剂(GolgiStop,BD)维持2h来刺激R10培养基(RPMI 1640、10%胎牛血清和抗生素)中的脾细胞。然后对刺激的脾细胞的淋巴细胞表面标志物CD8 α 和CD4进行染色,将该脾细胞固定,透化,然后对细胞内累积的IFN- γ 和TNF α 进行染色。使用抗小鼠CD8 α 、CD4、IFN- γ 和TNF α 的抗体,并在抗CD16/CD32存在的情况下进行染色。进行流式细胞术并在BD Accuri C6软件中进行分析。

[0528] 补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

[0529] 在96孔组织培养微板中以 2×10^4 个细胞/孔的密度将MC38-CEA2肿瘤细胞培养过夜。以1:50稀释度添加合并的热灭活小鼠血清,并在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。然后以1:50稀释度添加兔血清作为补体来源,并在37 $^{\circ}$ C下将细胞再温育2.5小时。根据制造商的说明书,使用Promega Cytotox 96非放射性细胞毒性测定法测定细胞培养上清液。通过公式%裂解=(实验-靶标自发)/(靶标最大值-靶标自发) $\times 100\%$ 来计算MC38-CEA2细胞的裂解百分比。

[0530] 抗肿瘤免疫治疗研究:

[0531] 进行研究以分别在具有已建立的表达CEA、MUC1或Brachyury的肿瘤的小鼠中检测免疫治疗研究中的基于Ad5[E1-, E2b-]的三重疫苗的抗肿瘤能力。在该研究中,对基于Ad5[E1-, E2b-]的三重疫苗的各个组分的抗肿瘤活性进行了评估。

[0532] 用 5×10^5 个表达CEA、MUC1和/或Brachyury的鼠肿瘤细胞在右肋皮下注射C57B1/6小鼠组($n=7$)。检测到明显的肿瘤后,通过分别用Ad5[E1-, E2b-]-空壳(无转基因,例如空载体)、Ad5[E1-, E2b-]-CEA(6D)、Ad5[E1-, E2b-]-mMUC1-C和/或Ad5[E1-, E2b-]-Brachyury各 1×10^{10} 个VP皮下注射3次来治疗小鼠。计算肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。7-10只小鼠/组对于治疗的统计评价是足够的。

[0533] 对于体内肿瘤治疗研究,将8-10周龄的雌性C57BL/6小鼠在左侧皮下植入 10^6 个MC38-MUC1细胞。用 10^{10} VP Adeno-MUC1或Tri-Ad5以7天的间隔对小鼠进行三次治疗。用 3×10^{10} VP的Adeno-空壳注射对照小鼠。通过测量两个相对的尺寸(a,b)和根据公式 $V = (a \times b)^2 / 2$ 计算的体积来评估肿瘤生长,其中较短的尺寸为“a”。当肿瘤达到 1500mm^3 或变得严重溃烂时,肿瘤研究终止。

[0534] 在通过免疫治疗进行治疗的携带表达MUC1的肿瘤的小鼠中具有显著的抗肿瘤活性和增加的存活期(图26)。重要的是,使用流式细胞术来确定MC38-MUC1细胞系表达PDL1并且尽管存在PDL1仍实现了抗肿瘤活性。C57B1/6小鼠($n=7$ /组)在左侧皮下接种表达MC38-MUC1的肿瘤细胞,并在第0、7、14天在右侧施用 10^{10} VP的Ad5-空壳(空载体)或 10^{10} VP的Ad5[E1-, E2b-]-mMUC1-C。

[0535] 用Ad5[E1-, E2b-]-mMUC1-C治疗的小鼠相比于对照在第15天和第18天具有显著($P < 0.05$)更小的肿瘤(顶部)并具有显著更长的存活期(底部)。数值=平均值 $\pm$ SEM。实验在第36天终止(图26)。

[0536] 用Ad5[E1-, E2b-]-Brachyury进行免疫治疗的小鼠产生更小的肿瘤(图27)。简言之,将C57B1/6小鼠在左侧皮下接种表达MC38-Brachyury的肿瘤细胞,并在第5、11和17天在右侧施用 10^{10} VP的Ad5-空壳(空载体)($N=4$)或 10^{10} VP的Ad5[E1-, E2b-]-Brachyury($N=5$)。在第15、19和22天,治疗的小鼠中的肿瘤更小。数值=平均值 $\pm$ SEM(图27)。

[0537] 将对大量的小鼠进行治疗以显示显著的抗肿瘤活性,并将免疫治疗与免疫途径检查点调节剂如抗检查点抑制剂抗体相组合,以确定抗肿瘤活性是否得到增强。

[0538] 实施例8:由重组病毒载体导致的人T细胞活化的体外验证

[0539] 肿瘤细胞培养

[0540] 使用人结肠癌SW620(HLA-A2⁺、HLA-A24⁺、brachyury⁺、MUC1⁺、CEA⁺)和胰腺癌ASPC-1(HLA-A1⁺、HLA-A26⁺、MUC1⁺)细胞系。细胞培养物不含支原体并维持在完全培养基(补充有10%FBS、100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和2mM L-谷氨酰胺的RPMI-1640)中。

[0541] 细胞因子的检测

[0542] 使用ELISA试剂盒评估在无IL-2培养基中用感染有腺病毒载体的DC或肽脉冲的DC刺激24h的T细胞上清液的IFN- γ 分泌。该分析中使用的抗原特异性T细胞系先前已有报道:(a)HLA-A2 CEA特异性CTL,(b)HLA-A2 MUC1特异性CTL,(c)HLA-A24 MUC1特异性CTL,和(d)HLA-A2 brachyury特异性CTL。

[0543] 细胞毒性测定

[0544] 简言之,用50 μ Ci的¹¹¹In氧化物将靶细胞在37℃下标记20min,并以在96孔圆底培养板中3,000个细胞/孔进行使用。以不同的比例添加T细胞,并在37℃下温育16h。收获上清液用于 γ 计数。以一式三份进行测定,并计算SD。通过将靶细胞与单独的培养基一起温育来确定自发释放,并通过与0.25%Triton X-100一起温育来确定完全裂解。使用以下公式计算特异性裂解:裂解(%)=[观察到的释放(CPM)-自发释放(CPM)]/[完全释放(CPM)-自发释放(CPM)]x100。

[0545] 使用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)和Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury载体进行体外研究以评估树突细胞(DC)功能和抗原特异性T细胞活化。简言之,在具有IL-2和GM-CSF的培养基中将人DC培养6-7天。用Ad5[E1-,E2b-]-CEA(6D)或Ad5[E1-,E2b-]-Brachyury或Ad5[E1-,E2b-]-空壳(空载体)感染在AIM-V培养基中培养的DC,并将该DC温育2天。未感染的DC用作对照。

[0546] 然后通过流式细胞术对人DC细胞的、如通过平均荧光强度所测量的CD80(DC成熟的标志物)、CD83(DC成熟的标志物)、CD86(DC标志物)和DR(DC标志物)的表达进行分析。如表6中所示,感染有基于Ad5[E1-,E2b-]的载体的DC诱导人DC的活化和成熟。

[0547] 表6

[0548]	治疗	MOI	% CD80+ 细胞	% CD83+ 细胞	% CD86+ 细胞	% DR+ 细胞
	未感染对照	0	20.2%	33.6%	99.5%	94.4%
	Ad5[E1-, E2b-]-空壳感 染	10,000	40.7%	40.9%	99.2%	98.0%
	Ad5[E1-, E2b-]-CEA(6D) 感染	10,000	56.8%	48.7%	99.2%	98.3%

[0549] 用腺病毒载体(Ad5[E1-,E2b-]-CEA、Ad5[E1-,E2b-]-MUC1、Ad5[E1-,E2b-]-brachyury和Ad5[E1-,E2b-]-空壳)以指示的感染复数(10,000或20,000的MOI)将1mL AIM-V培养基中的树突细胞(2×10^5)在6孔板中感染1小时。然后将AIM-V培养基(4mL)添加到各孔并再温育2天。为了分析转基因表达的功效,收获DC并使用流式细胞术和蛋白质印迹进行分析。对于表型分析,使用BV421偶联的抗CD80、PerCP Cy5.5偶联的抗CD83、APC-Cy7偶联的抗HLA-DR、PE偶联的抗CD86和FITC偶联的抗CEA对DC进行染色以用于CD80、CD83、CD86、CEA和HLA-DR的表达。如表7中所示,Ad5载体诱导人DC的成熟和活化。以10,000或20,000感染复数(MOI)的浓度使用指示的腺病毒载体用于人树突细胞(DC)的感染。通过流式细胞术分析CD80、CD83、CD86和HLA-DR的表达。结果以%阳性细胞表示(平均荧光强度)。

[0550] 表7

[0551]

治疗	MOI	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
对照	0	20.2 (146)	33.6 (259)	99.5 (4586)	94.4 (1355)
Ad5 [E1-, E2b-]-空壳	10,000	40.7 (162)	40.9 (253)	99.2 (3794)	98.0 (4489)
Ad5 [E1-, E2b-]-空壳	20,000	47.4 (169)	46.8 (266)	98.6 (3012)	95.7 (3203)
Ad5 [E1-, E2b-]-CEA	10,000	56.8 (189)	48.7 (262)	99.2 (3877)	98.3 (6553)
Ad5 [E1-, E2b-]-CEA	20,000	54.5 (185)	46.6 (271)	99.1 (3628)	98.0 (6015)
Ad5 [E1-, E2b-]-MUC1	10,000	41.4 (167)	42.4 (251)	98.5 (3178)	96.9 (5227)
Ad5 [E1-, E2b-]-MUC1	20,000	46.7 (172)	44.3 (260)	98.9 (3591)	97.2 (5779)

[0552] 为了确定感染的人DC是否可以刺激人抗原特异性T细胞系分泌IFN- γ , 将感染的DC与抗原特异性T细胞系一起温育并测试DC的IFN- γ 分泌活性。如表8中所示, 只有与感染有Ad5 [E1-, E2b-]-CEA (6D) 或Ad5 [E1-, E2b-]-Brachyury的相应HLA-A2+DC一起温育的CEA或Brachyury抗原特异性HLA-A2+T细胞系被刺激分泌IFN- γ 。在对照中未检测到IFN- γ 分泌。感染有基于Ad5 [E1-, E2b-]的载体的HLA-A2+DC可激活抗原特异性T细胞以产生IFN- γ 。

[0553] 表8

[0554]

治疗	MOI	抗原特异性 T 细胞系	
		CEA (HLA-A2+) (pg IFN- γ /10 ⁵ 个细胞/mL)	Brachyury (HLA-A2+) (pg IFN- γ /10 ⁵ 个细胞/mL)
未感染对照	0	<15.6	<15.6
无 DC	0	<15.6	<15.6
Ad5 [E1-, E2b-]-空壳	10,000	<15.6	<15.6

[0555]

感染			
Ad5 [E1-, E2b-]-CEA(6D)感染	10,000	122.7	未进行
Ad5 [E1-, E2b-]-Brachyury 感染	10,000	未进行	145.6

[0556] 用Ad5 [E1-, E2b-]-CEA (6D) 和Ad5 [E1-, E2b-]-Brachyury的混合物感染HLA-A2+DC。感染的DC用于使用自体PBMC生成特异性细胞毒性HLA-A2+T淋巴细胞 (CTL)。自体DC用作

三种体外刺激 (IVS) 的APC。在3次IVS后使用经CEA或Brachyury脉冲的自体B细胞再刺激抗原特异性CTL。效应T细胞与靶肿瘤细胞的比例为30:1,并确定溶细胞活性百分比。如表9中所示,感染有Ad5 [E1-, E2b-]-CEA (6D) 和Ad5 [E1-, E2b-]-Brachyury的混合物的HLA-A2+DC可生成抗原特异性溶细胞性T细胞。以HLA-A2依赖性方式检测溶细胞活性。

[0557] 表9

[0558]	抗原特异性 T 细胞系	SW620 细胞 (表达 HLA-A2+、CEA 和 Brachyury)的裂解 百分比	ASPC-1 细胞 (表达 HLA-A1+和 CEA)的裂解百分 比
	CEA 特异性 HLA-A2+ T 细胞	42.4%	4.3%
	Brachyury 特异性 HLA-A2+ T 细胞	64.4%	8.3%

[0559] 为了确定感染的人DC是否可以刺激人抗原特异性T细胞系裂解靶肿瘤细胞。用指示的腺病毒载体以20,000感染复数 (MOI) 感染人DC (在IL-4和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 中的6天培养物;在0.5mL的AIM-V中, 2×10^4 个细胞/孔)。48小时后,将DC洗涤并用来刺激人抗原特异性T细胞。结果以每 1×10^5 个T细胞/ml的IFN- γ 的pg/ml表示。表10证明,感染有编码CEA、MUC1或brachyury的重组腺病毒载体的人DC可激活抗原特异性T细胞系。粗体数字表示与具有未感染DC的相应孔相比的IFN- γ 分泌的显著增强。[--表示未进行测定。]

[0560] 表10

[0561]	DC 感染有	抗原特异性 T 细胞系			
		CEA	MUC1 (HLA-A2)	MUC1 (HLA-A24)	Brachyury
	Ad5 [E1-, E2b-]-空壳	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6
	Ad5 [E1-, E2b-]-brachyury	<15.6	--	--	351.9
	Ad5 [E1-, E2b-]-MUC1	<15.6	335.2	806.4	--
	Ad5 [E1-, E2b-]-CEA	350.0	<15.6	<15.6	--
	未感染的 DC	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6
	仅 T 细胞	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6

[0562] 在0.5mL的AIM-V中用Tri-Ad5载体以 2×10^4 个/孔 (24孔板) 感染来自HLA-A2和HLA-A24供体的人DC (在IL-4和GM-CSF中的6天培养物)。以20,000MOI使用Tri-Ad5载体1小时,然后向各孔加入1.5mL的AIM-V。将感染的DC温育48小时,然后洗涤并用于刺激人抗原特异性T细胞。结果以每 1×10^5 个T细胞/ml的IFN- γ 的pg数表示。粗体数字表示与具有未感染DC的相应孔相比的IFN- γ 分泌的显著增强。

[0563] 生成CEA-、MUC1-和brachyury-特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。如上所述,用20,000MOI的Tri-Ad5感染树突细胞(在1ml的AIM-V中,1-2x10⁵个/孔)。以10:1的效应物-APC比例将感染的DC用作用于刺激自体非贴壁细胞的APC。在37℃下、在含有5%CO₂的潮湿气氛中将培养物温育3天。然后向培养物补充rhIL-2持续7天;每3天补充一次含有IL-2的培养基。10天的刺激构成一次体外刺激(IVS)循环。自体载体感染的DC用作三次IVS的APC。在三次IVS后使用自体肽脉冲的B细胞再刺激抗原特异性CTL。将T细胞系维持在含有IL-7和IL-15(10ng/ml)的培养基中。

[0564] 用Tri-Ad5以20,000MOI感染来自前列腺癌患者的人DC(在IL-4和GM-CSF中的6天培养物;在0.5mL的AIM-V中,2x10⁴个细胞/孔)。48h后,将感染的DC洗涤,并用于使用自体外周血单核细胞(PBMC)作为效应物生成特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。在3次体外刺激循环后,将自体肽脉冲的B细胞用作抗原呈递细胞。结果以IFN- γ 的pg/ml表示[--表示未进行测定]。如表11中所示,当用brachyury、MUC1和CEA脉冲的自体B细胞刺激时,感染的人树突细胞可生成针对这些肽的抗原特异性T细胞,并产生IFN- γ 。

[0565] 表11

[0566]		肽(10 μg/ml)			
	抗原特异性 T 细胞系	CEA	MUC1(A2)	MUC1(A24)	Brachyury
	T-Brachyury	<15.6	--	--	243
	T-MUC1 (A2)	<15.6	174	--	--
	T-MUC1 (A24)	<15.6	--	206	--
	T-CEA	211	<15.6	--	--

[0567] 生成CEA-、MUC1-和brachyury-特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。如上所述,用20,000MOI的Tri-Ad5感染树突细胞(在1ml的AIM-V中,1-2x10⁵个/孔)。以10:1的效应物-APC比例将感染的DC用作用于刺激自体非贴壁细胞的APC。在37℃下、在含有5%CO₂的潮湿气氛中将培养物温育3天。然后向培养物补充rhIL-2持续7天;每3天补充一次含有IL-2的培养基。10天的刺激构成一次体外刺激(IVS)循环。自体载体感染的DC用作三次IVS的APC。在三次IVS后使用自体肽脉冲的B细胞再刺激抗原特异性CTL。将T细胞系维持在含有IL-7和IL-15(10ng/ml)的培养基中。

[0568] 在0.5mL的AIM-V中用Tri-Ad5载体以2x10⁴个/孔(24孔板)感染来自HLA-A2和HLA-A24供体的人DC(在IL-4和GM-CSF中的6天培养物)。以20,000MOI使用Tri-Ad5载体1小时,然后向各孔加入1.5mL的AIM-V。将感染的DC温育48小时,然后洗涤并用于刺激人抗原特异性T细胞。结果以每1x10⁵个T细胞/ml的IFN- γ 的pg数表示。感染有编码转基因的Tri-Ad5载体的人树突细胞可激活抗原特异性T细胞系产生IFN- γ 。如表12中所示,当用brachyury、MUC1和CEA脉冲的自体B细胞刺激时,感染有Tri-Ad5的人树突细胞可生成针对相应肽的抗原特异性T细胞,并产生IFN- γ 。粗体数字表示与具有未感染DC的相应孔相比的IFN- γ 分泌的显著增强。

[0569] 表12

DC 感染有	抗原特异性 T 细胞系			
	CEA (HLA-A2)	MUC1 (HLA-A2)	MUC1 (HLA-A24)	Brachyury (HLA-A2)
Tri-Ad5	480	236	763	496
Ad5 [E1, E2b]-空壳	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6
未感染的 DC	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6
仅 T 细胞	<15.6	<15.6	<15.6	<15.6

[0571] 这些研究显示,基于Ad5[E1-,E2b-]的载体可在体外诱导人DC的成熟,感染的DC可刺激抗原特异性人T细胞,并且感染的DC可生成抗原特异性人CTL。在此处报道的研究中,多种TAA靶向的免疫治疗(Tri-Ad5,其由表达不同TAA的三种Ad5载体的混合物组成)在激活人T细胞方面与各种腺病毒载体单独使用时一样有效,并且只有微小的差异。通过用Ad5[E1-,E2b-]-CEA、Ad5[E1-,E2b-]-MUC1和Ad5[E1-,E2b-]-brachyury载体中的每种单独地对小鼠进行疫苗接种与用Tri-Ad5进行疫苗接种来测量9种不同的体内参数。在所进行的21项测定中,相比于进行Tri-Ad5疫苗接种的小鼠,在使用一种载体进行疫苗接种的小鼠中观察到的统计学差异为(a) MUC1特异性脾细胞和产生CD8⁺IFN的T细胞和多功能CD8⁺T细胞的增加的数目,以及(b)更多的CEA特异性的产生CD8⁺IFN的T细胞。在另一方面,采用Tri-Ad5进行疫苗接种的小鼠比采用Ad5[E1-,E2b-]-CEA进行疫苗接种的小鼠产生更多的CEA特异性的产生IL-2的细胞。然而,在其他16/21测定中,在以下方面,使用单一载体与使用Tri-Ad5的结果没有统计学差异:(a)用于IFN- γ 和IL-2产生的脾细胞的抗原特异性活化,(b)用于IFN- γ 产生的CD8⁺T细胞的抗原特异性活化,(c)用于IFN- γ 产生的CD4⁺T细胞的抗原特异性活化,(d)用于IFN- γ 和TNF- α 产生的多功能CD8⁺T细胞的抗原特异性活化,(e)用于IFN- γ 和TNF- α 产生的多功能CD4⁺T细胞的抗原特异性活化,以及(f)产生抗原特异性抗体的抗原特异性活化。使用单一载体(Ad5[E1-,E2b-]-MUC1)与Tri-Ad5疫苗相比,在抗肿瘤活性方面也没有差异;虽然两种疫苗均没有消除肿瘤,但两种疫苗以相似的方式降低了肿瘤生长速度。虽然Tri-Ad5在一些测定中在T细胞活化方面效率不高,但Tri-Ad5平台克服人类实体瘤中存在的TAA异质性的潜在能力远超过在一些测定中Tri-Ad5与单个载体在T细胞活化效力方面的相对较小差异。

[0572] CEA、MUC1和brachyury均为人类TAA,并且在鼠实体瘤中不表达。此外,人类实体瘤在不同TAA的表达方面非常不均一。用所有三种转基因转染鼠肿瘤细胞系以确定Tri-Ad5与每种载体单独进行疫苗接种的效果将是非常困难的。选择表达MUC1的鼠肿瘤靶向是因为,在一些鼠T细胞测定中,单一Ad5[E1-,E2b-]-MUC1载体相比于Tri-Ad5比CEA和brachyury载体相比于Tri-Ad5更有效。因此,这似乎是将Tri-Ad5平台与单一载体平台进行比较的最严格模型。本文报道的研究被设计用于为使用这种靶向Tri-Ad5方案中不同范围的TAA转基因的新型腺病毒疫苗递送平台(Ad5[E1-,E2b-])的作为疫苗免疫治疗的潜在临床研究或与其他治疗剂的组合使用提供基本原理。

[0573] 虽然检查点抑制剂抗体已显示出在黑素瘤和鳞状非小细胞肺癌中的临床活性的

证据,但在少数患者中已观察到在其他癌症类型中的临床益处。对于一些肿瘤类型,如结肠直肠癌和前列腺癌,抗PDL1/PD1检查点抑制剂已显示出少量的临床活性。针对在一些患者中缺乏PDL1/PD1治疗活性而提出的一个假设是肿瘤中缺乏T细胞浸润。因此,如果肿瘤中靶向TAA的疫苗将导致肿瘤微环境中抗原特异性T细胞的存在,则组合使用或在疫苗接种后使用的免疫途径检查点调节剂将能够“释放肿瘤浸润性无反应性T细胞的制动器”,从而产生临床效果。

[0574] 实施例9:HPV的免疫治疗

[0575] 该实施例显示,如本文所提供的联合治疗减少了肿瘤以及表达HPV早期6 (E6) 和早期7 (E7) 致癌基因的鼠模型的HPV相关癌症。简言之,用包含经修饰的非致癌融合HPV-E6/E7基因的Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7疫苗治疗携带肿瘤的HPV鼠模型小鼠并治疗携带肿瘤的小鼠。用于诱导小鼠中的肿瘤的TC-1鼠肿瘤细胞系表达HPV-E6/E7以及PDL1。

[0576] 使用流式细胞术检测携带HPV肿瘤的小鼠中的肿瘤,并计算各种肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的丰度。观察到肿瘤中的TIL具有以下细胞类型和丰度水平:骨髓来源的抑制性细胞(MDSC) ($7.5\% \pm 2.4SD$)、表达FoxP3的调节性T (Treg) 淋巴细胞 ($7.1\% \pm 2.5$)、表达PD1的CD8 α +淋巴细胞 ($25.5\% \pm 16.4$) 和表达LAG-3的CD8 α +淋巴细胞 ($4.1\% \pm 2.3$)。TIL的这种特征表明,肿瘤中存在抑制性免疫途径。

[0577] 向Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7免疫治疗中添加免疫检查点抑制剂抗体,如抗PD1抗体,导致更强的抗肿瘤应答(图28)。此外,观察到该组中的两只小鼠具有基本完全的肿瘤消退(图29)。简言之,向C57Bl/6小鼠(n=7/组)植入表达HPV-E6/E7的TC-1肿瘤细胞(第0天),并通过在第10、17、24天用 10^{10} VP的Ad5-空壳(空载体)加100 μ g对照IgG(腹膜内), 10^{10} VP的Ad5-空壳(空载体)加100 μ g抗PD1, 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7加100 μ g小鼠IgG,或 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-HPV-E6/E7加100 μ g抗PD1进行免疫治疗来治疗C57Bl/6小鼠。使用或不使用抗PD1的免疫治疗到第23天导致肿瘤生长的显著抑制($P<0.05$)。所有对照小鼠都由于肿瘤质量而到第23天被终止。数值=平均值 $\pm$ SEM(图28)。

[0578] 对通过用抗PD1注射进行免疫治疗的2只小鼠中的肿瘤生长和消退进行了分析(图29)。肿瘤生长分别在第20天和第27天达到峰值,此后消退。该研究表明,免疫检查点抑制剂药物与多靶向疫苗的组合使用可增强抗肿瘤效果。

[0579] 对使用与程序性死亡配体1 (PD1) 阻断相组合的病毒基因递送平台来免疫HPV 16基因E6和E7 (Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7) 的针对人乳头瘤病毒 (HPV) 的免疫治疗进行了研究,以确定该免疫治疗与单独使用疫苗相比是否可增强治疗效果。Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7作为单一药剂诱导HPV-E6/E7细胞介导的免疫。使用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7的免疫治疗导致具有较大已建立肿瘤的小鼠中的小肿瘤清除和总存活期益处。当免疫治疗与免疫检查点阻断相组合时,观察到对大肿瘤的抗肿瘤活性水平的升高。Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7治疗的小鼠中的肿瘤微环境分析显示出升高的CD8 $^{+}$ 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL);然而,观察到抑制机制的诱导,如程序性死亡配体1 (PDL1) 在肿瘤细胞上的表达和PD1 $^{+}$ TIL的增加。当Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫治疗与抗PD1抗体组合时,观察到CD8 $^{+}$ TIL处于相同的水平,但肿瘤细胞上的肿瘤PDL1表达降低并且PD1 $^{+}$ TIL降低,从而提供了联合治疗有利于肿瘤清除状态的机制,并为未来临床试验中抗原特异性疫苗与免疫途径检查点调节剂配对提供了基本原理。

[0580] 本文中对与PD1阻断相组合的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫的抗肿瘤效果增强进行

了检测。还对由Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7疫苗诱导的CMI应答进行了表征,并确定了抗肿瘤应答的动力学,以评估治疗已建立的小与大肿瘤的治疗潜力。为了研究可能的作用机制,对肿瘤实质内的效应T细胞与抑制T细胞水平之间的关系进行了评估,并对淋巴细胞群体和可能在观察到的抗肿瘤应答中发挥作用的共抑制分子的表达进行了表征。

[0581] 病毒构建

[0582] 构建并产生Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7。简言之,使用基于同源重组的方法将转基因亚克隆到Ad5[E1-,E2b-]载体中,并使复制缺陷型病毒在E.C7包装细胞系中繁殖,进行CsCl₂纯化,并将滴定的病毒感染滴度确定为E.C7细胞单层上的空斑形成单位(PFU)数。通过十二烷基硫酸钠(SDS)破坏以及在260nm和280nm处的分光光度测定来确定病毒颗粒(VP)浓度。作为载体对照,使用Ad5[E1-,E2b-]-空壳,其为没有转基因插入片段的Ad5平台骨架。

[0583] 免疫和脾细胞制备

[0584] 用不同剂量的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7或Ad5[E1-,E2b-]-空壳皮下(SQ)注射雌性C57BL/6小鼠(n=5/组)。在25μl注射缓冲液(具有3%蔗糖的20mM HEPES)中施用剂量,并以14天的间隔对小鼠进行三次免疫。在最后一次注射后14天,收集脾和血清。将来自小鼠的血清在-20℃下冷冻直到评估。通过破坏脾囊并轻柔地按压内容物通过70μm尼龙细胞过滤器来产生脾细胞的悬浮液。通过添加红细胞裂解缓冲液来裂解红细胞,并在裂解后将脾细胞在R10(补充有L-谷氨酰胺(2mM)、HEPES(20mM)(Corning,Corning,NY)、青霉素(100U/ml)和链霉素(100μg/ml),以及10%胎牛血清的RPMI 1640)中洗涤两次。通过ELISpot和流式细胞术测定脾细胞的细胞因子产生。

[0585] 酶联免疫吸附斑点(ELISpot)测定

[0586] 通过使用如上所述制备的新鲜分离的小鼠脾细胞进行的ELISpot测定来确定HPV E6和E7特异性的分泌干扰素-γ(IFN-γ)的T细胞。进行ELISpot测定。合成跨越HPV E6和E7的整个编码序列的重叠肽库作为具有11个氨基酸重叠的15-mer,并将冻干的肽库溶解于DMSO中。用2μg/mL/肽的衍生自E6或E7的库中的重叠15-mer肽刺激脾细胞(2x10⁵个细胞)。用0.06μg/孔浓度的伴刀豆球蛋白A(Con A)刺激细胞作为阳性对照。使用衍生自SIV-Nef(美国国立卫生研究院国立变态反应与传染病研究所艾滋病部门的艾滋病研究与参考试剂计划(AIDS Research and Reference Reagent Program,Division of AIDS,NIAID,NIH))的重叠15-mer完整肽库作为不相关的肽对照。使用Immunospot ELISpot板读数器确定斑点形成细胞(SFC)的数目,并将结果报告为每10⁶个脾细胞的SFC数目。

[0587] 细胞内细胞因子刺激

[0588] 如上文针对ELISpot测定所述制备脾细胞。使用96孔U底板以每个孔10⁶个活脾细胞进行刺激测定。通过以2μg/mL/肽添加HPV E6、HPV E7或SIV-Nef肽库并在37℃下、5%CO₂中温育6h,并在温育开始后两小时添加蛋白质转运抑制剂(GolgiStop,BD)来刺激R10培养基中的脾细胞。然后将刺激的脾细胞的淋巴细胞表面标志物CD8α和CD4染色,将刺激的脾细胞用多聚甲醛固定,透化,并对细胞内累积的IFN-γ和TNF-α进行染色。从BD购买了抗小鼠CD8α(克隆53-6.7)、CD4(克隆RM4-5)、IFN-γ(克隆XMG1.2)和TNF-α(克隆MP6-XT22)的荧光偶联抗体,并在抗CD16/CD32(克隆2.4G2)存在的情况下进行染色。使用Accuri C6流式细胞仪(BD)进行流式细胞术并使用BD Accuri C6软件进行分析。

[0589] 肿瘤免疫治疗

[0590] 对于体内肿瘤免疫治疗研究,将8-10周龄的雌性C57BL/6小鼠在左侧皮下植入 2×10^5 个表达HPV-E6/E7的TC-1肿瘤细胞。用 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7的皮下注射以7天的间隔对小鼠进行三次治疗。按照相同的方案用 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳注射对照小鼠。在组合研究中,在免疫的同时通过腹腔注射给予小鼠100 μ g大鼠抗PD1(克隆RMP1-14)或同种型大鼠对照抗体(克隆2A3)。大鼠抗PD1抗体和大鼠IgG_{2a}同种型对照抗体购自BioXcell。通过两个相对的尺寸(a,b)来测量肿瘤大小,并根据公式 $V = (a^2 \times b) / 2$ 来计算体积,其中“a”为较短的尺寸。当肿瘤达到1500mm³或当肿瘤变溃烂时,对动物执行安乐死。通过流式细胞术进行的肿瘤浸润细胞(TIL)的分析

[0591] 在第0天将四组8-10周龄的雌性C57BL/6小鼠(n=5/组)在左侧皮下植入 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞。用 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳载体对照对这些组中的两组进行皮下免疫,并用 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7疫苗对其他两组进行皮下免疫。从第12天开始以7天的间隔将这些免疫施用两次。除了免疫之外,在第12天和第16天向一个Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7组和一个Ad5[E1-,E2b-]-空壳组中的小鼠皮下施用100 μ g大鼠抗PD1(克隆RMP1-14),并在第19天和第23天皮下施用100 μ g仓鼠抗PD1(克隆J43),以增加抗PD1的有效剂量。为了控制采用这些免疫途径检测点调节剂的治疗,在同一天向其余的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7和Ad5[E1-,E2b-]-空壳组中的小鼠施用相关的大鼠和仓鼠对照IgG抗体。仓鼠抗PD1抗体和同种型对照购自BioXcell。在第27天,对肿瘤进行测量、切除并称重。将肿瘤切碎并用在Hank平衡盐溶液(HBSS)中的胶原酶IV(1mg/ml)、透明质酸酶(100 μ g/ml)和DNA酶IV(200U/ml)的混合物在室温下消化30min并在80rpm下旋转。酶购自Sigma-Aldrich。消化后,放置肿瘤悬浮液通过70 μ m尼龙细胞过滤器并进行离心。通过添加红细胞裂解缓冲液(Sigma-Aldrich)去除红细胞,并在裂解后,将肿瘤悬浮液在含有1% (w/v) 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤两次并重悬于荧光激活细胞分选(FACS)缓冲液(PBS pH 7.2, 1%胎牛血清和2mM EDTA)中用于染色。抗CD45(30-F11)、CD4(RM4-5)和PDL1(MIH5)的荧光偶联抗体购自BD。抗CD8 β (H35-17.2)、CD25(PC61.5)、FoxP3(FJK-16s)、PD1(RMP1-30)、LAG-3(C9B7W)和CTLA4(UC10-4B9)的荧光偶联抗体均购自eBioscience。在100 μ L含有抗CD16/CD32(克隆2.4G2)的FACS缓冲液中,在4 $^{\circ}$ C下进行表面染色30分钟。将染色的细胞在FACS缓冲液中洗涤,用多聚甲醛固定,并且(如果需要)在透化缓冲液(eBioscience)中进行透化,然后在100 μ L含有抗CD16/CD32(克隆2.4G2)的透化缓冲液中,在4 $^{\circ}$ C下用荧光偶联的抗FoxP3或抗CTLA4染色60分钟。将细胞用透化缓冲液洗涤,洗涤回到FACS缓冲液中,并通过使用BD Accuri C6流式细胞仪进行的流式细胞术来分析固定体积的各种样品。将肿瘤细胞定义为包含小细胞和大细胞的散射门控中的CD45⁺事件。将CD4⁺TIL定义为淋巴细胞散射门控中的CD45⁺/CD4⁺事件。将CD8⁺TIL定义为淋巴细胞散射门控中的CD45⁺/CD8 β ⁺事件。将调节性T细胞(Treg)定义为淋巴细胞散射门控中的CD45⁺/CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺事件。将效应CD4⁺T细胞定义为淋巴细胞散射门控中的CD45⁺/CD4⁺/CD25⁻/FoxP3⁻事件。使用同种型匹配的对照抗体来确定FoxP3、PDL1、PD1、LAG-3和CTLA4的阳性表达。使用Accuri C6流式细胞仪(BD)进行流式细胞术,并在BD Accuri C6软件中进行分析。

[0592] 由Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7诱导的HPV-E6/E7特异性细胞介导的免疫应答

[0593] 进行研究以确定增加剂量的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫对小鼠中CMI应答的诱导的影响。用 10^8 、 10^9 或 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7以14天的间隔对C57BL/6小鼠组(n=5/

组)进行三次皮下免疫。对照小鼠接受 10^8 VP、 10^9 VP或 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳(空载体对照)。最后一次免疫后两周,通过针对分泌IFN- γ 的细胞的ELISpot分析来评估脾细胞CMI应答。观察到剂量效应,并通过用 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行免疫而获得最高的CMI应答水平。在注射有Ad5的对照小鼠中没有检测到应答。

[0594] 还在用 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫的小鼠中对CD8 α^+ 和CD4 $^+$ 脾细胞群体中IFN- γ 和TNF- α 的细胞内累积进行了测定。用重叠肽库刺激后的细胞内细胞因子染色(ICS)显示出分离自用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫的所有小鼠的CD8 α^+ 淋巴细胞中的E6和E7抗原特异性IFN- γ 累积。还对肽刺激的脾细胞进行染色用于测定TNF- α 的细胞内累积,并且能够检测到对E6和E7均具有特异性的多功能(IFN- γ^+ /TNF- α^+)CD8 α^+ 脾细胞的显著群体。

[0595] 表达HPV-E6/E7的肿瘤的治疗

[0596] 对免疫治疗在携带HPV-E6/E7 TC-1肿瘤的小鼠中的抗肿瘤作用进行了研究。如通过流式细胞术分析所评估的,这些肿瘤细胞表达PDL1。当用PE偶联的抗PDL1标记时,TC-1细胞具有537的中值荧光强度(MFI),而用PE偶联的同种型对照抗体标记的细胞具有184的MFI,表明在TC-1细胞的表面上存在免疫抑制性PDL1(数据未示出)。在第0天向两组C57BL/6小鼠($n=5$ /组)皮下接种 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞至右侧肋下区域。在第1、8和14天,通过皮下注射 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳(载体对照)或 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7来治疗小鼠。监测所有小鼠的肿瘤大小,并计算肿瘤体积。用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫的小鼠从第12天开始比对照小鼠具有显著更小的肿瘤($p<0.01$),并在实验的剩余时间保持显著更小($p<0.02$),包括5只小鼠中的3只显示出完全的肿瘤消退。来自载体对照治疗组的小鼠中的肿瘤在第26天开始达到安乐死阈值,并且该组中的所有小鼠均到第33天被执行安乐死,而Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7治疗组中的小鼠在第36天实验结束时均存活,并具有小肿瘤($<150\text{mm}^3$)的完全肿瘤消退。

[0597] 为了确定用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行的免疫治疗对较大肿瘤是否有效,将TC-1肿瘤细胞肿瘤植入两组C57BL/6小鼠($n=4$ /组)中,然后在肿瘤植入后的6天内,在肿瘤小但可察觉时用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行每周延迟治疗。在第6天开始治疗的小鼠最初表现出与对照组相似的肿瘤生长;然而,从第16天开始,观察到肿瘤消退。在第6天开始治疗的小鼠中的肿瘤显著小于在第20天开始治疗的对照组($p<0.05$),并且4只小鼠中的3只到第27天具有完全的消退。在第6天开始的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7施用也赋予显著的存活期益处($p<0.01$)。

[0598] 最后,为了确定用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行的免疫治疗对大的已建立肿瘤是否有效,将TC-1肿瘤细胞植入两组C57BL/6小鼠($n=4$ /组)中,然后当肿瘤为 $\sim 100\text{mm}^3$ 时用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行每周延迟治疗,直到肿瘤植入后13天。在该治疗组中,观察到初始肿瘤生长与对照组相似,但对照组中的一些小鼠在第23天达到安乐死标准,从而阻止在进一步的时间点进行显著性分析。然而,Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7治疗组中的肿瘤体积到第29天仍低于安乐死阈值,而在该时间点,来自载体对照组中的所有小鼠的肿瘤均超过 1500mm^3 ,并被执行安乐死。这些结果表明,在TC-1肿瘤模型中,Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫治疗剂是肿瘤生长的有效抑制剂,并导致显著的总存活期益处,但只有在治疗开始于较小的肿瘤时才观察到肿瘤的完全清除。此外,这些结果表明,尽管肿瘤细胞上存在免疫抑制性PDL1,但用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7进行的免疫治疗剂治疗导致肿瘤生长的显著抑制。

[0599] 免疫治疗与免疫检查点抑制组合

[0600] 为了确定在大肿瘤的环境中Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7的治疗效果是否可得到改善,共同施用抗PD1抗体。在第0天向4组小鼠($n=7$ /组)植入 2×10^5 个TC-1肿瘤细胞,并且从第10天开始,使小鼠每周接受 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7的皮下施用加 $100\mu\text{g}$ 抗PD1的腹腔施用、 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳加 $100\mu\text{g}$ 抗PD1、 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加 $100\mu\text{g}$ 大鼠IgG_{2a}同种型对照,或 10^{10} VP的Ad5[E1-,E2b-]-空壳加 $100\mu\text{g}$ 大鼠IgG_{2a}同种型对照的施用。随着时间的推移监测肿瘤大小,并当肿瘤大小超过 1500mm^3 或当存在肿瘤溃疡时,对小鼠执行安乐死。接受Ad5[E1-,E2b-]-空壳加 $100\mu\text{g}$ 大鼠IgG_{2a}同种型对照的对照小鼠和用Ad5[E1-,E2b-]-空壳加 $100\mu\text{g}$ 抗PD1治疗的小鼠显示出相似的肿瘤生长模式。在这两组之间没有观察到显著的存活期益处。与对照相比,接受Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加大鼠IgG_{2a}同种型对照的小鼠具有延迟的肿瘤生长模式,并且其中2只小鼠在肿瘤植入后第52天具有接近基线水平的肿瘤消退。接受Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7和抗PD1的7只小鼠中的4只从第25天开始具有肿瘤消退,并且这些小鼠中的两只到第53天实验结束时产生肿瘤清除。

[0601] 用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加大鼠IgG_{2a}同种型对照治疗的小鼠(图7)也经历了存活期益处,其中28.6%的动物在研究终止时存活,而100%的对照小鼠(Ad5[E1-,E2b-]-空壳加大鼠IgG_{2a}同种型对照)和Ad5[E1-,E2b-]-空壳加抗PD1治疗的小鼠不得不分别在第28天和第32天终止(图7)。用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7和抗PD1抗体两者进行治疗的小鼠具有最大的治疗益处(图7),显示了与对照相比的延迟的肿瘤生长和存活期的显著改善($P \leq 0.0006$)。

[0602] 通过用大鼠抗PD1抗体进行第二次注射(ELISA的终点抗体滴度为1:200,数据未示出)来诱导小鼠抗大鼠IgG抗体应答,并且通过第三次注射使这些应答显著增加(ELISA的终点抗体滴度为1:4000至1:8000,数据未示出)。这种抗大鼠抗体应答可以解释为何在单独用抗PD1抗体注射后没有观察到抗肿瘤活性。此外,第一次注射和可能进行的抗PD1抗体与Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫治疗组合的第二次注射可能是有效的,但采用抗PD1进行的第三次注射被诱导的小鼠抗大鼠IgG应答有效地中和。

[0603] 联合免疫治疗后的肿瘤微环境

[0604] 为了分析有助于在Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7治疗的小鼠中延迟的肿瘤生长和存活的细胞群体,通过流式细胞术分析肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。向4组小鼠植入 2×10^5 个TC-1细胞,并在10天后以每周采用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7加PD1抗体免疫两次开始治疗。在第27天,如材料和方法中所述收集并处理整个肿瘤。与接受Ad5[E1-,E2b-]-空壳的组相比,在Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7治疗组中,每毫克肿瘤的浸润CD8⁺T细胞数目显著增加。抗PD1抗体治疗对浸润CD8⁺T细胞的数目具有很小的影响或没有影响。在每毫克肿瘤的浸润Treg(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)数目方面,四组中的任何组之间都没有差异。然而,当用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7疫苗或Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7疫苗加抗PD1抗体治疗来治疗小鼠时,CD8⁺T细胞的增加导致肿瘤微环境中Treg:CD8⁺T细胞比例下降。

[0605] 为了进一步研究抗PD1抗体对Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7免疫治疗的协同/加性效应,针对TIL检测PD1、LAG-3和CTLA-4的表达。已表明在肿瘤微环境内这些共抑制分子在T细胞上的表达下调了抗原特异性T细胞的活化。采用Ad5[E1-,E2b-]-E6/E7的免疫加对照抗体治疗显著增加了PD1⁺和LAG-3⁺CD8⁺TIL的分数,而这些共抑制分子在CD4⁺TIL上的表达不受这

种治疗的影响。表达CTLA-4的CD4⁺和CD8⁺TIL的百分比没有被疫苗治疗显著影响(数据未示出)。相比于在来自用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7加对照抗体治疗的小鼠的肿瘤中发现的PD1⁺CD8⁺和CD4⁺TIL的分数,将抗PD1抗体注射与Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7疫苗治疗相组合导致PD1⁺CD8⁺和CD4⁺TIL的分数显著降低(对于CD8⁺TIL,p=0.0083,而对于CD4⁺TIL,p=0.0016)。此外,PD1⁺CD8⁺TIL的分数降低至在Ad5[E1⁻,E2b⁻]-空壳治疗对照组中所观察到的表达水平,并且PD1⁺CD4⁺TIL的分数显著降低至低于在对照组中所观察到的水平(p=0.0016)。此外,还观察到当Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7免疫与抗PD1检查点抑制剂组合时,LAG-3⁺CD8⁺TIL的百分比降低(p=0.0363)。由于之前已经表明,疫苗治疗可增强PDL1在离体肿瘤细胞上的表达,因此针对肿瘤细胞检测PDL1的表达。疫苗治疗后肿瘤细胞上PDL1的中值荧光强度增加。然而,在用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7和抗PD1抗体的联合治疗的小鼠中,PDL1表达降低,但该水平仍显著高于在Ad5[E1⁻,E2b⁻]-空壳治疗的对照小鼠中所观察到的表达水平。

[0606] 总之,数据表明,Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7可以以剂量依赖性方式诱导HPV-E6/E7导向的CMI应答,从而导致肿瘤细胞上PDL1的上调。采用最高剂量疫苗的携带肿瘤的小鼠中的多次同源免疫导致显著的抗肿瘤活性和增加的存活期,尤其是在携带小肿瘤的小鼠中。重要的是,当在具有大肿瘤的小鼠中将采用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7进行的免疫治疗与抗PD1相组合时,实现了更大程度的抗肿瘤活性。总体而言,采用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7疫苗进行的免疫与抗PD1抗体相组合导致具有较少消耗性/无变应性表型的CD8⁺和CD4⁺效应物群体的增加,因此有利于在肿瘤微环境中平衡至更加促炎的状态。联合治疗与大肿瘤质量降低相关联这一观察结果表明,采用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7进行的免疫治疗与抗PD1抗体相组合可能会增加HPV相关头颈癌或宫颈癌患者的免疫治疗期间的临床疗效。此外,数据表明,采用Ad5[E1⁻,E2b⁻]-E6/E7疫苗进行的临床试验应当与免疫途径检查点调节剂相组合,并保持高优先级。

[0607] 可以组合上述各个实施方案以提供进一步的实施方案。本说明书中提及的和/或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用而整体并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

[0608] 如果需要使用各个专利、申请和出版物的概念以提供另外的实施方案,则可对实施方案的各个方面进行修改。

[0609] 可以根据以上的详述描述对实施方案进行这些及其他改变。总之,在以下权利要求中,所使用的术语不应被理解为将权利要求限制于说明书和权利要求中所公开的具体实施方案,而应被理解为包括所有可能的实施方案连同这样的权利要求所具有的等同项的全部范围。因此,权利要求不受本公开内容的限制。

<110> 埃图比克斯公司

<120> 用于联合免疫治疗的方法和组合物

<130> 39891-718.601

<140> PCT/US2016/012496

<141> 2016-01-07

<150> 62/150,236

<151> 2015-04-20

[0001]

<150> 62/101,969

<151> 2015-01-09

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2109

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1		
atggagtctc cctcgcccc tccccacaga tggatcatcc cctggcagag gctcctgctc	60	
acagcctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg ccaagctcac tattgaatcc	120	
acgccgttca atgtcgcaga ggggaaggag gtgcttctac ttgtccacaa tctgccccag	180	
catctttttg gctacagctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata	240	
ggatatgtaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg catacagtgg tcgagagata	300	
atatacccca atgcatccct gctgatccag aacatcatcc agaatgacac aggattctac	360	
[0002]		
accctacag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggcca gttccgggta	420	
taccgggagc tgccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaaccgt ggaggacaag	480	
gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggacg caacctacct gtggtgggta	540	
aacaatcaga gcctcccgtg cagtcccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc	600	
actctattca atgtcacaag aaatgacaca gcaagctaca aatgtgaaac ccagaacca	660	
gtgagtgccg ggcgcagtga ttcagtcate ctgaatgtcc tctatggccc ggatgcccc	720	
accatttccc ctctaaacac atcttacaga tcaggggaaa atctgaacct ctctgccac	780	

	gcagcctcta acccacctgc acagtactct tggtttgtca atgggacttt ccagcaatcc	840
	acccaagagc tctttatccc caacatcact gtgaataata gtggatccta tacgtgccaa	900
	gcccataact cagacactgg cctcaatagg accacagtca cgacgatcac agtctatgca	960
	gagccacca aacccttcat caccagcaac aactccaacc ccgtggagga tgaggatgct	1020
	gtagccttaa cctgtgaacc tgagattcag aacacaacct acctgtggtg ggtaaataat	1080
	cagagcctcc cggtcagtcc caggctgcag ctgtccaatg acaacaggac ctcactcta	1140
[0003]	ctcagtgtca caaggaatga tgtaggaccc tatgagtgtg gaatccagaa cgaattaagt	1200
	gttgaccaca gcgaccagt catcctgaat gtctctatg gccagacga cccaccatt	1260
	tccccctcat acacctatta ccgtccaggg gtgaacctca gcctctctg ccatgcagcc	1320
	tctaaccac ctgcacagta ttcttggtg attgatggga acatccagca acacacaaa	1380
	gagctcttta tctccaacat cactgagaag aacagcggac tctatactg ccaggccaat	1440
	aactcagcca gtggccacag caggactaca gtcaagacaa tcacagtctc tgcgagctg	1500
	cccaagccct ccatctccag caacaactcc aaaccctgg aggacaagga tgctgtggcc	1560

	ttcacctgtg aacctgaggc tcagaacaca acctacctgt ggtgggtaaa tggtcagagc	1620
	ctcccagtcg gtcccaggct gcagctgtcc aatggcaaca ggaccctcac tctattcaat	1680
	gtcacaagaa atgacgcaag agcctatgta tgtggaatcc agaactcagt gagtgcaaac	1740
	cgcagtgacc cagtcaccct ggatgtcctc tatgggccgg acacccccat catttcccc	1800
	ccagactcgt cttacctttc gggagcgaac ctcaacctct cctgccactc ggctctaac	1860
	ccatccccgc agtattcttg gcgtatcaat gggataccgc agcaacacac acaagttctc	1920
[0004]	tttatcgcca aaatcacgcc aaataataac gggacctatg cctgttttgt ctctaacttg	1980
	gctactggcc gcaataattc catagtcaag agcatcacag tctctgcac tggaaacttct	2040
	cctgtgtctc cagctggggc cactgtcggc atcatgattg gagtgtgtgt tggggttgct	2100
	ctgatatag	2109

<210> 2

<211> 2109

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2		
	atggagtctc cctcggtccc tccccacaga tgggtgcatcc cctggcagag gctcctgctc	60
	acagcctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg ccaagctcac tattgaatcc	120
	acgccgttca atgtcgaga ggggaaggag gtgcttctac ttgtccaca tctgccccag	180
	catctttttg gctacagctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata	240
	ggatatgtaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg catacagtgg tcgagagata	300
[0005]	atatacccca atgcatccct gctgatccag aacatcatcc agaatgacac aggattctac	360
	accctacag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggcca gttccgggta	420
	taccgggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaaccgt ggaggacaag	480
	gatgctgtgg cttcacctg tgaacctgag actcaggacg caacctacct gtggtgggta	540
	aacaatcaga gcctcccggt cagtcccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc	600
	actctattca atgtcacaag aatgacaca gcaagctaca aatgtgaaac ccagaaccca	660
	gtgagtgccg ggcgagtg ttcagtcac ctgaatgtcc tctatggccc ggatgcccc	720

	accatttccc ctctaaacac atcttacaga tcaggggaaa atctgaacct ctcctgccac	780
	gcagcctcta acccacctgc acagtactct tggtttgta atgggacttt ccagcaatcc	840
	accaagagc tctttatccc caacatcact gtgaataata gtggatccta tacgtgccaa	900
	gcccataact cagacactgg cctcaatagg accacagtca cgacgatcac agtctatgca	960
	gagccacca aacccttcat caccagcaac aactccaacc ccgtggagga tgaggatgct	1020
	gtagccttaa cctgtgaacc tgagattcag aacacaacct acctgtggtg ggtaaataat	1080
[0006]	cagagcctcc cggtcagtc caggetgcag ctgtccaatg acaacaggac ctcacteta	1140
	ctcagtgtca caaggaatga ttaggagccc tatgagtgtg gaatccagaa cgaattaagt	1200
	gttgaccaca gcgaccagc catcctgaat gtctcttatg gccagacga cccaccatt	1260
	tccccctcat acacctatta ccgtccaggg gtgaacctca gcctctctg ccatgcagcc	1320
	tctaaccac ctgcacagta ttcttggtg attgatggga acatccagca acacacaaa	1380
	gagctcttta tctccaacat cactgagaag aacagcggac tctatactg ccaggccaat	1440
	aactcagcca gtggccacag caggactaca gtcaagacaa tcacagtctc tgcggagctg	1500

	cccaagccct ccattctccag caacaactcc aaacccgtgg aggacaagga tgctgtggcc	1560
	ttcacctgtg aacctgaggc tcagaacaca acctacctgt ggtgggtaaa tggtcagagc	1620
	ctcccagtea gtcccaggct gcagctgtcc aatggcaaca ggaccctcac tctattcaat	1680
	gtcacaagaa atgacgcaag agcctatgta tgtggaatcc agaactcagt gagtgc aaac	1740
	cgcagtgacc cagtcaccct ggatgtcctc tatgggccgg acaccccat catttcccc	1800
	ccagactcgt cttaccttc gggagcgaac ctcaacctct cctgccactc ggcctctaac	1860
[0007]	ccatccccgc agtattcttg gcgtatcaat gggataccgc agcaacacac acaagttctc	1920
	tttatcgcca aaatcacgcc aaataataac gggacctatg cctgttttgt ctctaacttg	1980
	gctactggcc gcaataattc catagtcaag agcatcacag tctctgcac tggaacttct	2040
	cctggctctc cagctggggc cactgtcggc atcatgattg gagtgcctgt tggggttgct	2100
	ctgatatag	2109
	<210> 3	
	<211> 32315	
	<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 3

	catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt	60
	ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt	120
	gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg	180
[0008]	gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag	240
	taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga	300
	agtgaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tactgtaata gtaatcaatt	360
	acggggtcac tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaa	420
	ggcccgccctg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt	480
	cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta ttacggtaa	540
	actgccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc	600

	aatgacggta aatggcccg ctagcattat gccagttaca tgaccttatg ggactttcct	660
	acttggcagt acatctacgt attagtcacg gctattacca tggatgatgcg gttttggcag	720
	tacatcaatg ggctggata gcggtttgac tcaaggggat ttccaagtct ccacccatt	780
	gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac	840
	aactccgcc cattgacga aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc	900
	agagctggtt tagtgaaccg tcagatccgc tagagatctg gtaccgtcga cgcggccgct	960
[0009]	cgagcctaag cttagtaccg agctcgatc cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat	1020
	tcggttaaa ggtaccaga gcagacagcc gccaccatgg agtctccctc ggccctccc	1080
	cacagatggt gcatccctg gcagaggctc ctgctcacag cctcacttct aaccttctgg	1140
	aaccgcca cactgcca gctcactatt gaatccagc cgttcaatgt cgcagagggg	1200
	aaggaggtgc ttctacttgt ccacaatctg cccagcatc tttttggcta cagctgttac	1260
	aaagtgaaa gattgatgg caaccgtcaa attataggat atgtaatagg aactcaaca	1320
	gctacccag ggccgcata cagtggctga gagataatat accccaatgc atccctgctg	1380

	atccagaaca tcatccagaa tgacacagga ttctacaccc tacacgtcat aaagtcagat	1440
	cttgtgaatg aagaagcaac tggccagttc cgggtatacc cggagctgcc caagccctcc	1500
	atctccagca acaactccaa acccgtggag gacaaggatg ctgtggcctt cacctgtgaa	1560
	cctgagactc aggacgcaac ctacctgtgg tgggtaaaca atcagagcct cccggtcagt	1620
	cccaggctgc agctgtccaa tggcaacagg accctcactc tattcaatgt cacaagaaat	1680
	gacacagcaa gctacaaatg tgaaaccag aaccagtgga gtgccaggcg cagtgattca	1740
[0010]	gtcatcctga atgtctcteta tggcccggat gccccacca tttcccctct aaacacatct	1800
	tacagatcag gggaaaatct gaacctctcc tgccacgcag cctctaacc acctgcacag	1860
	tactcttggt ttgtcaatgg gactttccag caatccaccc aagagctctt tatecccaac	1920
	atcactgtga ataatagtgg atcctatacg tgccaagccc ataactcaga cactggcctc	1980
	aataggacca cagtcacgac gatcacagtc tatgcagagc cacccaaacc ctcatcacc	2040
	agcaacaact ccaaccccgt ggaggatgag gatgctgtag ccttaacctg tgaacctgag	2100
	attcagaaca caacctacct gtggtgggta aataatcaga gcctcccgt cagtcccagg	2160

	ctgcagctgt ccaatgacaa caggaccctc actctactca gtgtcacaag gaatgatgta	2220
	ggaccctatg agtgtggaat ccagaacgaa ttaagtgttg accacagcga cccagtcac	2280
	ctgaatgtcc tctatggccc agacgacccc accatttccc cctcatacac ctattaccgt	2340
	ccaggggtga acctcagcct ctctgccat gcagcctcta acccacctgc acagtattct	2400
	tggctgattg atgggaacat ccagcaacac acacaagagc tctttatctc caacatcact	2460
	gagaagaaca gcggactcta tacctgccag gccataact cagccagtgg ccacagcagg	2520
[0011]	actacagtca agacaatcac agtctctgcg gagctgccca agccctccat ctccagcaac	2580
	aactccaaac ccgtggagga caaggatgct gtggccttca cctgtgaacc tgaggctcag	2640
	aacacaacct acctgtgtg ggtaaattgt cagagcctcc cagtcagtcc caggctgcag	2700
	ctgtccaatg gcaacaggac cctcactcta ttcaatgtca caagaaatga cgcaagagcc	2760
	tatgtatgtg gaatccagaa ctcagtgagt gcaaaccgca gtgaccagc caccctggat	2820
	gtcctctatg ggccggacac ccccatcatt tccccccag actcgtctta cctttcggga	2880
	gcggacctca acctctcctg ccactcggcc tctaaccat cccgcagta ttcttggcgt	2940

	atcaatggga taccgcagca acacacacaa gtctcttita tcgccaaaat cagccaaat	3000
	aataacggga cctatgcctg tttgtctct aacttggcta ctggccgcaa taattccata	3060
	gtcaagagca tcacagtctc tgcatctgga acttctcctg gtctctcage tggggccact	3120
	gtcggcacat tgattggagt gctggttggg gttgctctga tatagcagcc ctggtgtagt	3180
	ttcttcattt caggaagact gacagttgtt ttgcttcttc cttaaagcat ttgcaacagc	3240
	tacagtctaa aattgcttct ttaccaagga tatttacaga aaagactctg accagagatc	3300
[0012]	gagaccatcc tctagataag atatccgac caccggatct agataactga tcataatcag	3360
	ccataccaca ttgttagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctccacacc tcccctgaa	3420
	cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg tttattgcag cttataatgg	3480
	ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaataaa gcattttttt cactgcattc	3540
	tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttaacgc ggatctgggc gtggttaagg	3600
	gtgggaaaga atatataagg tgggggtctt atgtagtttt gtatctgttt tgcagcagcc	3660
	gccgccgcca tgagcaccaa ctcgtttgat ggaagcattg tgagtcata ttgacaacg	3720

	cgcatgcccc catgggccgg ggtgcgtcag aatgtgatgg gctccagcat tgatggtcgc	3780
	cccgtcctgc ccgcaaactc tactaccttg acctacgaga ccgtgtctgg aacgccgttg	3840
	gagaactgcag cctccgccgc cgcttcagcc gctgcagcca ccgcccgcgg gattgtgact	3900
	gactttgctt tcctgagccc gttgcaagc agtgcagctt cccgttcac cgcgccgat	3960
	gacaagttga cggtctttt ggcaacaattg gattctttga cccgggaact taatgtcgtt	4020
	tctcagcagc tgttgatct gcgccagcag gtttctgccc tgaaggcttc ctcccctccc	4080
[0013]	aatgcggttt aaaacataaa taaaaaacca gactctgttt ggatttggat caagcaagt	4140
	tcttctgtc tttatttagg ggttttgcgc gcgcggtagg cccgggacca gcggtctcgg	4200
	tcgttgaggg tcctgtgtat ttttccagg acgtggtaaa ggtgactctg gatgttcaga	4260
	tacatgggca taagcccgtc tctggggtgg aggtagcacc actgcagagc ttcatgtcgc	4320
	ggggtggtgt ttagatgat ccagtcgtag caggagcgtt gggcgtggtg cctaaaaatg	4380
	tccttcagta gcaagctgat tgccaggggc aggcccttgg tgtaagtgtt tacaagcgg	4440
	ttaagctggg atgggtgcat acgtgggat atgagatgca tcttgactg tatTTTTtagg	4500

	ttggctatgt tcccagccat atccctccgg ggattcatgt tgtgcagaac caccagcaca	4560
	gtgtatccgg tgcacttggg aaatttgtca thtagcttag aaggaaatgc gtggaagaac	4620
	ttggagacgc ccttgtgacc tccaagattt tccatgcatt cgtccataat gatggcaatg	4680
	ggcccacggg cgggcgccctg ggcgaagata tttctgggat cactaacgtc atagtttgt	4740
	tccaggatga gatcgtcata ggccattttt acaaagcgcg ggcgagggt gccagactgc	4800
	ggtataatgg ttccatccgg ccaggggcg tagttaccct cacagatttg catttccac	4860
[0014]	gctttgagtt cagatggggg gatcatgtct acctgcggg cgatgaagaa aacggtttcc	4920
	ggggtagggg agatcagctg ggaagaaagc aggttcctga gcagctgca cttaccgcag	4980
	ccggtgggcc cgtaaatac acctattacc ggtgcaact ggtagttaag agagctgcag	5040
	ctgccgtcat cctgagcag gggggccact tcgttaagca tgtccctgac tcgcatgttt	5100
	tccctgacca aatccgccag aaggcgtcg ccgccagcg atagcagttc ttgcaaggaa	5160
	gcaaagtttt tcaacggttt gagaccgtcc gccgtaggca tgcttttgag cgtttgacca	5220
	agcagttcca ggcggtcca cagctcggtc acctgctcta cgcatctcg atccagcata	5280

	tctcctcgtt tcgcgggttg gggcggcttt cgctgtacgg cagtagtcgg tgctcgtcca	5340
	gacgggccag ggtcatgtct ttccacgggc gcagggtcct cgtcagcgta gtctgggtca	5400
	cggatgaagg gtgcgtccg ggctgcgcgc tggccagggt gcgcttgagg ctggtcctgc	5460
	tggtgctgaa gcgtgccgg tcttcgccct gcgcgtcggc caggtagcat ttgaccatgg	5520
	tgtcatagtc cagccctcc gcggcgtggc ccttggcgcg cagcttgccc ttggaggagg	5580
	cgccgcacga ggggcagtgc agacttttga gggcgtagag cttgggcgcg agaaataccg	5640
[0015]	attccgggga gtagcatcc gcgccgagg cccgcagac ggtctcgcatt tccacagacc	5700
	aggtgagctc tggecgttcg gggtaaaaa ccaggtttcc cccatgcttt ttgatgcgtt	5760
	tcttacctct ggtttccatg agccggtgtc cacgctcggg gacgaaaagg ctgtccgtgt	5820
	ccccgtatac agacttgaga ggctgtcct cgagcgggtg tccgcggtec tctcgtata	5880
	gaaactcgga ccactctgag acaaaggctc gcgtccaggc cagcacgaag gaggctaagt	5940
	gggaggggta gcggtcgttg tccactaggg ggtccactcg ctccagggtg tgaagacaca	6000
	tgctgccctc ttcggcatca aggaaggatga ttggtttgta ggtgtaggcc acgtgaccgg	6060

	gtgttcctga aggggggcta taaaaggggg tgggggcgcg ttcgtcctca ctctcttccg	6120
	catcgctgtc tgcgagggcc agctgttggg gtgagtactc cctctgaaaa gcgggcatga	6180
	cttctgcgct aagattgtca gtttccaaaa acgaggagga ttgatattc acctggcccg	6240
	cggatgatgcc tttagagggtg gccgcatcca tctggtcaga aaagacaatc tttttgttgt	6300
	caagcttggt ggcaaacgac ccgtagaggg cgttggacag caacttggcg atggagcgca	6360
	gggttttggt tttgtcgcga tcggcgcgct ccttggccgc gatgtttagc tgcacgtatt	6420
[0016]	cgcgcgcaac gcaccgccat tcgggaaaga cggtggtgcg ctctcgggc accaggtgca	6480
	cgcgccaacc gcggttgtgc agggtgacaa ggtcaacgt ggtggctacc tctccgcgta	6540
	ggcgtcgtt ggtccagcag aggcggccgc ctttgcgcga gcagaatggc ggtagggggt	6600
	ctagctcgt ctctcggg ggtctcgt ccacggtaaa gacccgggc agcaggcgcg	6660
	cgtcgaagta gtctatctt catccttgca agtctagcgc ctgctgcat gcgcgggcg	6720
	caagcgcgcg ctctatggg ttgagtggg gacccatgg catggggtg gtgagcgcg	6780
	aggcgtacat gccgcaaatg tcgtaaacgt agaggggctc tctgagtatt ccaagatatg	6840

	tagggtagca tcttccaccg cggatgctgg cgcgcacgta atcgtatagt tcgtgcgagg	6900
	gagcgaggag gtcgggaccg aggttgctac gggcgggctg ctctgctcgg aagactatct	6960
	gcctgaagat ggcatgtgag ttggatgata tggttggacg ctggaagacg ttgaagctgg	7020
	cgtctgtgag acctaccgcg tcacgcacga aggaggcgta ggagtcgcgc agcttgttga	7080
	ccagctcggc ggtgacctgc acgtctaggg cgcagtagtc cagggtttcc ttgatgatgt	7140
	catacttata ctgtcccttt ttttccaca gctcgcggtt gaggacaaac tcttcgcggt	7200
[0017]	ctttccagta ctcttgatc ggaaaccgt cggcctccga acggttaagag cctagcatgt	7260
	agaactggtt gacggcctgg taggcgcagc atcccttttc tacgggtagc gcgtatgcct	7320
	gcgcggcctt ccggcatgac cagcatgaag ggcacgagct gcttcccaa ggccccatc	7380
	caagtatagg tctctacatc gtaggtgaca aagagacgct cggtcgcagg atgcgagccg	7440
	atcggaaga actggatctc ccgccaccaa ttggaggagt ggctattgat gtggtgaaag	7500
	tagaagtccc tgcgacgggc cgaacactcg tgctggcttt tgtaaaaacg tgcgcagtac	7560
	tggcagcggt gcacgggctg tacatcctgc acgaggttga cctgacgacc gcgcacaagg	7620

	aagcagagtg ggaatttgag cccctcgcct ggcggtttg gctggtggc ttctacttcg	7680
	gctgcttgtc cttgaccgtc tggctgctcg aggggagtta cggtggatcg gaccaccacg	7740
	ccgcgcgagc ccaaagtcca gatgtccgcg cgcggcggtc ggagcttgat gacaacatcg	7800
	cgcagatggg agctgtccat ggtctggagc tcccgcggcg tcaggtcagg cgggagctcc	7860
	tgcaggttta cctcgcatac acgggtcagg gcgcgggcta gatccagtg atacctaatt	7920
	tccaggggct ggttggtggc ggcgtcgatg gcttgcaaga ggccgcatcc ccgcggcgcg	7980
[0018]	actacggtac cgcgcggcgg gcggtgggcc gcgggggtgt ccttgatga tgcatctaaa	8040
	agcggtgacg cgggcgagcc cccggaggta gggggggctc cggacccgcc gggagagggg	8100
	gcaggggcac gtccggcccg cgcgcgggca ggagctggtg ctgcgcgct aggttgctgg	8160
	cgaacgcgac gacgcggcgg ttgatctcct gaatctggcg cctctgcgtg aagacgacgg	8220
	gcccgtgag ctggaacctg aaagagagtt cgacagaatc aatttcggtg tcgttgacgg	8280
	cggcctggcg caaaatctcc tgcacgtctc ctgagttgtc ttgataggcg atctcgcca	8340
	tgaactgctc gatctcttcc tctggagat ctccgcgtcc ggctcgtcc acggtggcgg	8400

	cgaggtcgtt ggaaatgcgg gccatgagct gcgagaaggc gttgaggcct ccctcgttcc	8460
	agacgcggct gtagaccacg ccccttcgg catcgcgggc gcgcatgacc acctgcgcga	8520
	gattgagctc cacgtgccgg gcgaagacgg cgtagtttcg caggcgctga aagaggtagt	8580
	tgagggtggt ggcggtgtgt tctgccacga agaagtacat aaccacgcgt cgcaacgtgg	8640
	attcgttgat aattgttttg taggtactcc gccgccgagg gacctgagcg agtccgcac	8700
	gaccgatcg gaaaacctct cgagaaaggc gtctaaccag tcacagtcgc aaggtaggct	8760
[0019]	gagcaccgtg gcgggcggca gcgggcggcg gtcggggttg tttctggcgg aggtgctgct	8820
	gatgatgtaa ttaaagtagg cgtcttgag acggcggatg gtcacagaa gcaccatgtc	8880
	cttgggtccg gcctgtgaa tgcgcaggcg gtcggccatg cccaggtt cgttttgaca	8940
	tcggcgcagg tctttgtagt agtcttgcac gacccttct accggcactt cttcttctcc	9000
	ttctcttgt cctgcatttc ttgcatttat cgctgcggcg gcggcggagt ttggccgtag	9060
	gtggcgcctt ctctctccca tgcgtgtgac cccgaagccc ctcatcggt gaagcagggc	9120
	taggtcggcg acaacgcgct cggctaatat ggctgtctgc acctgcgtga gggtagactg	9180

	gaagtcaccc atgtccacaa agcgggtggta tgcgcccgtg ttgatgggtg aagtgcagtt	9240
	ggccataacg gaccagttaa cggctctggg acccggtgc gagagctcg tgtacctgag	9300
	acgcgagtaa gccctcgagt caaatacgta gtcgttgcaa gtccgcacca ggtactggta	9360
	tcccacaaaa aagtgcggcg gcggctggcg gtagaggggc cagcgtaggg tggccggggc	9420
	tccggggcg agatcttcca acataaggcg atgatatccg tagatgtacc tggacatcca	9480
	ggtgatgccg gcggcggtgg tggaggcgcg cggaaagtcg cggacgcggt tccagatgtt	9540
[0020]	gcgcagcggc aaaaagtgt ccatggtcgg gacgctctgg ccggtcaggc gcgcgcaatc	9600
	gttgacgtc tagcgtgcaa aaggagagcc tgtaagcggg cactcttccg tggctctggg	9660
	gataaattcg caagggtatc atggcggacg accgggggtc gagccccgta tccggccgtc	9720
	cgccgtgac catgcggtta ccgcccgcgt gtcgaacca ggtgtgcgac gtcagacaac	9780
	gggggagtgc tccttttggc ttctttccag gcgcggcggc tgctgcgcta gcttttttgg	9840
	ccactggcgg gcgcagcgt aagcggttag gctggaaagc gaaagcatta agtggctcgc	9900
	tcctgtagc cggagggtta tttccaagg gttgagtcgc gggacccccg gttcagatct	9960

	cggaccggcc ggactgcggc gaacgggggt ttgcctcccc gtcattgcaag accccgcttg	10020
	caaattcctc cggaaacagg gacgagcccc ttttttgctt ttcccagatg catccggtgc	10080
	tgcggcagat gcgccccct cctcagcagc ggcaagagca agagcagcgg cagacatgca	10140
	gggcaccctc cctcctcct accgcgtcag gaggggcgac atccgcggtt gacgcggcag	10200
	cagatggtga ttacgaacct ccgcggcgcc gggcccgcca ctacctggac ttggaggagg	10260
	gcgagggcct ggcgcggtta ggagcgccct ctcttgagcg gcaccaagg gtgcagctga	10320
[0021]	agcgtgatac gcgtgaggcg tacgtccgc ggcagaacct gtttcgcgac cgcgagggag	10380
	aggagcccga ggagatgcgg gatcgaaagt tccacgcagg gcgcgagctg cggcatggcc	10440
	tgaatcgca gcggttgctg cgcgaggagg acttttagcc cgacgcgca accgggatta	10500
	gtcccgcgcg cgcacacgtg gcggccgccc acctggtaac cgcatagag cagacggtga	10560
	accaggagat taactttcaa aaaagcttta acaaccacgt gcgtacgctt gtggcgcgcg	10620
	aggaggtggc tataggactg atgcatctgt gggactttgt aagcgcgctg gagcaaaacc	10680
	caaatagcaa gccgctcatg gcgcagctgt tccttatagt gcagcacagc agggacaacg	10740

	aggcattcag ggatgcgctg ctaaacaatag tagagcccga gggccgctgg ctgctcgatt	10800
	tgataaacat cctgcagagc atagtgggtgc aggagcgcag cttgagcctg gctgacaagg	10860
	tggccgccat caactattcc atgcttagcc tgggcaagtt ttacccccgc aagatatacc	10920
	ataccacctta cgttcccata gacaaggagg taaagatcga ggggttctac atgcgcatgg	10980
	cgctgaaggt gcttaccttg agcgacgacc tgggcgttta tcgcaacgag cgcattccaca	11040
	aggccgtgag cgtgagccgg cggcgcgagc tcagcgaccg cgagctgatg cacagcctgc	11100
[0022]	aaagggccct ggctggcacg ggcagcggcg atagagaggc cgagtcctac ttgacgcgg	11160
	gcgctgacct gcgtgggcc ccaagccgac gcgcctgga ggcagctggg gccggacctg	11220
	ggctggcgggt ggcacccgcg cgcgctggca acgtcggcgg cgtggaggaa tatgacgagg	11280
	acgatgagta cgagccagag gacggcgagt actaagcggg gatgtttctg atcagatgat	11340
	gcaagacgca acggacccgg cggcgcgggc ggcgctgcag agccagccgt ccgaccttaa	11400
	ctccacggac gactggcgcc aggtcatgga ccgcatcatg tcgctgactg cgcgcaatcc	11460
	tgacgcgttc cggcagcagc cgcaggccaa ccggtctctc gcaattcttg aagcggtggt	11520

	cccggcgcgc gcaaacccca cgcacgagaa ggtgctggcg atcgtaaacg cgctggccga	11580
	aaacagggcc atccggcccg acgaggccgg cctggtctac gacgcgctgc ttcagcgcgt	11640
	ggctcgttac aacagcggca acgtgcagac caacctggac cggtgggtgg gggatgtgcg	11700
	cgaggccgtg gcgcagcgtg agcgcgcgca gcagcagggc aacctgggct ccatggttgc	11760
	actaaacgcc ttcctgagta cacagcccgc caacgtgccg cggggacagg aggactacac	11820
	caactttgtg agcgcactgc ggctaattgt gactgagaca ccgcaaagtg aggtgtacca	11880
[0023]	gtctgggcca gactatTTTT tccagaccag tagacaaggc ctgcagaccg taaacctgag	11940
	ccaggttttc aaaaacttgc aggggctgtg gggggtgcgg gctccacag gcgaccgcgc	12000
	gaccgtgtct agcttgctga cgcccaactc gcgcctgtg ctgctgctaa tagcgcctt	12060
	cacggacagt ggcagcgtgt cccgggacac atacctaggt cacttgctga cactgtaccg	12120
	cgaggccata ggtcaggcgc atgtggacga gcatactttc caggagatta caagtgtcag	12180
	ccgcgcgctg gggcaggagg acacgggcag cctggaggca accctaaact acctgtgac	12240
	caaccggcgg cagaagatcc cctcgttgca cagtttaaac agcgaggagg agcgcatttt	12300

	gcgctacgtg cagcagagcg ttagccttaa cctgatgcgc gacggggtaa cgcccagcgt	12360
	ggcgttgac atgaccgcgc gcaacatgga accgggcatg tatgcctcaa accggccgtt	12420
	tatcaaccgc ctaatggact acttgcatcg cgcggccgcc gtgaaccccg agtatttcac	12480
	caatgccatc ttgaaccgc actggctacc gcccctggt ttctacaccg ggggattcga	12540
	ggtgcccag ggtaacgatg gattcctctg ggacgacata gacgacagcg tgttttcccc	12600
	gcaaccgcag accctgctag agttgcaaca gcgcgagcag gcagaggcgg cgctgcgaaa	12660
[0024]	ggaaagcttc cgcaggccaa gcagcttgct cgatctaggc gctgcggccc cgcggtcaga	12720
	tgctagtagc ccatttccaa gcttgatagg gtctcttacc agcactcgca ccaccgccc	12780
	gcgcctgctg ggcgaggagg agtacctaaa caactcgctg ctgcagccgc agcgcgaaaa	12840
	aaacctgcct ccggcatttc ccaacaacgg gatagagagc ctagtggaca agatgagtag	12900
	atggaagacg tacgcgcagg agcacaggga cgtgccaggc ccgcgcccgc ccaccgctcg	12960
	tcaaaggcac gaccgtcagc ggggtctggt gtgggaggac gatgactcgg cagacgacag	13020
	cagcgtcctg gatttgggag ggagtggcaa cccgtttgcg caccttcgcc ccaggtggg	13080

	gagaatgttt taaaaaaaaa aaagcatgat gcaaaataaa aaactcacca aggccatggc	13140
	accgagcgtt ggttttcttg tattccccctt agtatgcggc gcgcggcgat gtatgaggaa	13200
	ggtcctcctc cctcctacga gagtgtgggtg agcgcggcgc cagtggcggc ggcgtgggt	13260
	tctcccttcg atgtccccct ggaccgcgcg ttgtgcctc cgcgtacct gcgcctacc	13320
	ggggggagaa acagcatccg ttactctgag ttggcacccc tattcgacac caccctgtg	13380
	tacctggtgg acaacaagtc aacggatgtg gcatccctga actaccagaa cgaccacagc	13440
[0025]	aactttctga ccacgtcat tcaaaacaat gactacagcc cgggggaggc aagcacacag	13500
	accatcaatc ttgacgaccg gtcgcactgg ggcggcgacc tgaaaaccat cctgcatacc	13560
	aacatgcaa atgtgaacga gttcatgttt accaataagt ttaaggcgcg ggtgatgtg	13620
	tcgcgttgc ctactaagga caatcaggtg gagctgaaat acgagtgggt ggagttcacg	13680
	ctgcccgagg gcaactactc cgagaccatg accatagacc ttatgaacaa cgcgatcgtg	13740
	gagcactact tgaaagtggg cagacagaac ggggttcttg aaagcgacat cggggtaaag	13800
	tttgacaccc gcaacttcag actggggttt gaccccgta ctggtcttgt catgcctggg	13860

	gtatatacaa acgaagcctt ccatccagac atcattttgc tgccaggatg cggggtggac	13920
	ttcacccaca gccgcctgag caacttggtt ggcatccgca agcggcaacc cttccaggag	13980
	ggcttttagga tcacctacga tgatctggag ggtggtaaca ttcccgcact gttggatgtg	14040
	gacgcctacc aggcgagctt gaaagatgac accgaacagg gcgggggtgg cgcaggcggc	14100
	agcaacagca gtggcagcgg cgcggaagag aactccaacg cggcagccgc ggcaatgcag	14160
	ccggtggagg acatgaacga tcatgccatt cgcggcgaca ctttgccac acgggctgag	14220
[0026]	gagaagcgcg ctgaggccga agcagcggcc gaagctgccg cccccgctgc gcaacccgag	14280
	gtcagaagc ctcagaagaa accggtgatc aaaccctga cagaggacag caagaaacgc	14340
	agttacaacc taataagcaa tgacagcacc ttcaccagct accgcagctg gtaccttgca	14400
	tacaactacg gcgacctca gaccggaatc cgctcatgga ccctgctttg cactcctgac	14460
	gtaacctgcg gctcggagca ggtctactgg tcgttgccag acatgatgca agaccccgctg	14520
	accttcgct ccacgcgcca gatcagcaac ttccgggtgg tgggcgcca gctgttgcgc	14580
	gtgcactcca agagcttcta caacgaccag gccgtctact cccaactcat ccgccagttt	14640

	acctctctga cccacgtgtt caatcgcttt cccgagaacc agattttggc gcgcccacca	14700
	gccccacca tcaccaccgt cagtgaaaac gttcctgctc tcacagatca cgggacgcta	14760
	ccgtcgcgca acagcatcgg aggagtccag cgagtgacca ttactgacgc cagacgccgc	14820
	acctgcccct acgtttacaa ggccctgggc atagtctcgc cgcgcgtcct atcgagccgc	14880
	actttttgag caagcatgtc catccttata tcgccagca ataacacagg ctggggcctg	14940
	cgcttcccaa gcaagatgtt tggcggggcc aagaagcgtc ccgaccaaca cccagtgcgc	15000
[0027]	gtgcgcgggc actaccgcgc gccctggggc gcgcacaaac gcggccgcac tgggcgcacc	15060
	accgtcgatg acgccatcga cgcggtggtg gaggaggcgc gcaactacac gccacgccg	15120
	ccaccagtgt ccacagtgga cgcggccatt cagaccgtgg tgcgcggagc ccggcgctat	15180
	gctaaaatga agagacggcg gaggcgcgta gcacgtgcc accgccgcg acccggcact	15240
	gccgccaac gcgcggcggc ggccctgctt aaccgcgcac gtcgcaccgg ccgacggcg	15300
	gcatgcggg ccgctcgaag gctggccgcg ggtattgtca ctgtgcccc caggtccagg	15360
	cgacgagcgg ccgccgcagc agccgcggcc attagtgcta tgactcaggg tcgcaggggc	15420

	aacgtgtatt ggggtgcgca ctcggttagc ggcctgcgcg tgcccgtgcg caccgcgcc	15480
	ccgcgcaact agattgcaag aaaaaactac ttagactcgt actgttgtat gtatccagcg	15540
	gcggcggcgc gcaacgaagc tatgtccaag cgcaaatca aagaagagat gctccaggtc	15600
	atcgcgccgg agatctatgg cccccgaag aaggaagagc aggattaca gccccgaaag	15660
	ctaaagcggg tcaaaaagaa aaagaaagat gatgatgatg aacttgacga cgaggtggaa	15720
	ctgctgcacg ctaccgcgcc caggcgacgg gtacagtga aaggtcgacg cgtaaacgt	15780
[0028]	gttttgcgac ccggcaccac cgtagctttt acgcccgtg agcgtccac ccgcacctac	15840
	aagcgcgtgt atgatgaggt gtacggcgac gaggacctgc ttgagcaggc caacgagcgc	15900
	ctcggggagt ttgcctacgg aaagcggcat aaggacatgc tggcgttgcc gctggacgag	15960
	ggcaacccaa cacctagcct aaagcccgta aactgcagc aggtgctgcc cgcgcttgca	16020
	ccgtccgaag aaaagcgcg cctaaagcgc gagtctggtg acttggcacc caccgtgcag	16080
	ctgatggtac ccaagcgcca gcgactggaa gatgtcttgg aaaaaatgac cgtggaacct	16140
	gggctggagc ccgaggtccg cgtgcggcca atcaagcagg tggcgccggg actgggcgtg	16200

	cagaccgtgg acgttcagat acccactacc agtagcacca gtattgccac cgccacagag	16260
	ggcatggaga cacaacgtc cccggttgcc tcagcgttgg cggatgccgc ggtgcaggcg	16320
	gtcgtgcgg ccggtccaa gacctctacg gaggtgcaa cggaccctg gatgtttcgc	16380
	gtttcagccc cccggcgccc gcgccgttcg aggaagtacg gcgccgccag cgcgtactg	16440
	cccgaatatg ccctacatcc ttccattgcg cctacccccg gctatcgtgg ctacacctac	16500
	cgccccagaa gacgagcaac tacccgacgc cgaaccacca ctggaacctg ccgccgccgt	16560
[0029]	cgccgtcgcc agccctgct ggccccgatt tccgtgcga gggtagctcg cgaaggagc	16620
	aggacctgg tgctgccaac agcgcgtac caccagca tcgtttaaaa gccgtcttt	16680
	gtggttcttg cagatatggc cctcacctgc gcctccgtt tcccgtgcc gggattccga	16740
	ggaagaatgc accgtaggag gggcatggc ggccacggc tgacggcg catgcgtcgt	16800
	gcgcaccacc ggcgcgggcg cgcgtgcac cgtcgcatgc gcggcggtat cctgccctc	16860
	cttattccac tgatgccgc ggcgattggc gccgtgccg gaattgcatc cgtggccttg	16920
	caggcgcaga gacctgatt aaaaacaagt tgcattgga aaaatcaaaa taaaaagtct	16980

	ggactctcac gctcgcttgg tcctgtaact attttgtaga atggaagaca tcaactttgc	17040
	gtctctggcc ccgcgacacg gctcgcgccc gticcatggga aactggcaag atatcggcac	17100
	cagcaatatg agcgggtggcg ccttcagctg gggctcgtg tggagcggca ttaaaaattt	17160
	cggttccacc gttaagaact atggcagcaa ggcttggaa agcagcacag gccagatgct	17220
	gagggataag ttgaaagagc aaaatttcca acaaagggtg gtagatggcc tggcctctgg	17280
	cattagcggg gtggtggacc tggccaacca ggcagtgcaa aataagatta acagtaagct	17340
[0030]	tgatccccgc cctcccgtag aggagcctcc accggccgtg gagacagtgt ctccagagg	17400
	gcgtggcgaa aagcgctccg gccccgacag ggaagaaact ctggtgacgc aaatagacga	17460
	gcctccctcg tacgaggagg cactaaagca aggcctgccc accaccgctc ccatcgcgcc	17520
	catggctacc ggagtgtctg gccagcacac acccgtaacg ctggacctgc ctccccccgc	17580
	cgacaccag cagaaacctg tgctgccagg cccgaccgcc gttgttgtaa cccgtcctag	17640
	ccgcgcgtcc ctgcgccg cgcgcagcgg tccgcgatcg ttgcggcccg tagccagtgg	17700
	caactggcaa agcacactga acagcatcgt gggctctgggg gtgcaatccc tgaagcgccg	17760

	acgatgcttc tgatagctaa cgtgtcgtat gtgtgtcatg tatgcgtcca tgtcgccgcc	17820
	agaggagctg ctgagccgcc gcgcgccgc tttccaagat ggctaccctc tcgatgatgc	17880
	cgcagtggtc ttacatgcac atctcgggcc aggacgctc ggagtacctg agccccgggc	17940
	tggtgcagtt tgcccgcgcc accgagacgt acttcagcct gaataacaag tttagaaacc	18000
	ccacggtggc gcctacgcac gacgtgacca cagaccggtc ccagcgtttg acgctgcggt	18060
	tcatccctgt ggaccgtgag gatactgcgt actcgtacaa ggcgcggttc accctagctg	18120
[0031]	tgggtgataa ccggtgtctg gacatggctt ccacgtactt tgacatccgc ggcgtgctgg	18180
	acaggggccc tacttttaag ccctactctg gcactgccta caacgcctg gctcccaagg	18240
	gtgccccaaa tccttgcgaa tgggatgaag ctgctactgc tcttgaaata aacctagaag	18300
	aagaggacga tgacaacgaa gacgaagtag acgagcaagc tgagcagcaa aaaactcacg	18360
	tatttgggca ggcgcttat tctggataa atattacaaa ggagggtatt caaataggtg	18420
	tcgaaggtca aacacctaaa tatgccgata aaacatttca acctgaacct caaataggag	18480
	aatctcagtg gtacgaaaca gaaattaatc atgcagctgg gagagtccta aaaaagacta	18540

	ccccaatgaa accatgttac ggttcatatg caaaaccac aaatgaaaat ggagggcaag	18600
	gcattcttgt aaagcaacaa aatggaaagc tagaaagtca agtggaaatg caatTTTTCT	18660
	caactactga ggcagccgca ggcaatggtg ataacttgac tctaaagtg gtattgtaca	18720
	gtgaagatgt agatatagaa accccagaca ctcatatttc ttacatgcc actattaagg	18780
	aaggtaactc acgagaacta atgggccaac aatctatgcc caacaggcct aattacattg	18840
	cttttaggga caatTTTatt ggtctaattg attacaacag cacgggtaat atgggtgttc	18900
[0032]	tggcgggcca agcatcgag ttgaatgctg ttgtagattt gcaagacaga aacacagagc	18960
	tttcatacca gctTTTgctt gattccattg gtgatagaac caggTacttt tctatgtgga	19020
	atcaggctgt tgacagctat gatccagatg ttagaattat tgaaaatcat ggaactgaag	19080
	atgaacttcc aaattactgc tttccactgg gaggtgtgat taatacagag actcttacca	19140
	aggtaaaacc taaaacaggt caggaaaatg gatgggaaaa agatgctaca gaattttcag	19200
	ataaaaatga aataagagtt ggaaataatt ttgcatgga aatcaatcta atgccaaacc	19260
	tgtggagaaa tttctgtac tccaacatag cgtgtattt gccgacaag ctaaagtaca	19320

	gtccttccaa cgtaaaaatt tctgataacc caaacaccta cgactacatg aacaagcgag	19380
	tggtggctcc cgggctagtg gactgctaca ttaaccttgg agcacgctgg tcccttgact	19440
	atatggacaa cgtaaaccca ttttaaccacc accgcaatgc tggcctgcgc taccgctcaa	19500
	tgttgctggg caatggtcgc tatgtgccct tccacatcca ggtgcctcag aagttctttg	19560
	ccattaaaaa cctccttctc ctgccgggct catacaccta cgagtggaac ttcaggaagg	19620
	atgttaacat ggttctgcag agctccctag gaaatgacct aagggttgac ggagccagca	19680
[0033]	ttaagtttga tagcatttgc ctttacgcca ctttcttccc catggccac aacaccgcct	19740
	ccacgttga ggccatgctt agaaacgaca ccaacgacca gtcttttaac gactatctct	19800
	ccgccgcaa catgctctac cctatacccg ccaacgtac caacgtgcc atatccatcc	19860
	cctcccga cttggcggtt ttccgcggtt gggccttcac gcgccttaag actaaggaaa	19920
	ccccatcact gggctcgggc tacgaccctt attacaccta ctctggctct ataccctacc	19980
	tagatggaac cttttacctc aaccacacct ttaagaaggt ggccattacc ttgactctt	20040
	ctgtcagctg gcctggcaat gaccgcctgc ttacccccaa cgagtttgaa attaagcget	20100

	cagttgacgg ggagggttac aacgttgccc agtgtaacat gaccaaagac tggttcctgg	20160
	tacaaatgct agctaactat aacattggct accagggtt ctatatcca gagagctaca	20220
	aggaccgat gtactccttc tttagaaact tccagccat gagccgtcag gtggtggatg	20280
	atactaaata caaggactac caacaggtgg gcatactaca ccaacacaac aactctggat	20340
	ttgttgcta ccttgcccc accatgcgcg aaggacaggc ctacctgct aacttccct	20400
	atccgcttat aggcaagacc gcagttgaca gcattacca gaaaaagttt ctttgcgac	20460
[0034]	gcacccttg gcgcatcca ttctccagta actttatgtc catgggcgca ctcacagacc	20520
	tgggcaaaa cttctctac gccaaactcg ccacgcgt agacatgact tttaggttg	20580
	atcccatgga cgagcccacc cttctttatg tttgtttga agtctttgac gtggtccgtg	20640
	tgcaccagcc gcaccgggc gtcatacga cgtgtacct gcgcagccc ttctcgccg	20700
	gcaacgccac aacataaaga agcaagcaac atcaacaaca gctgccgcca tgggtccag	20760
	tgagcaggaa ctgaaagcca ttgtcaaaga tcttggttg gggccatatt ttttggcac	20820
	ctatgacaag cgtttccag gtttgtttc tccacacaag ctgcctgcg ccatagtcaa	20880

	tacggccggt cgcgagactg ggggcgtaca ctggatggcc ttgcctgga acccgactc	20940
	aaaaacatgc tacctctttg agccctttgg cttttctgac cagcgactca agcaggttta	21000
	ccagtttgag tacgagtcac tectgcgcg tagcgccatt gcttcttccc ccgaccgtg	21060
	tataacgtg gaaaagtcca cccaaagcgt acaggggccc aactcggcg cctgtggact	21120
	attctgctgc atgtttctcc acgcctttgc caactggccc caaactccca tggatcacia	21180
	ccccaccatg aaccttatta cgggggtacc caactccatg ctcaacagtc ccaggtaca	21240
[0035]	gcccaccctg cgtegcaacc aggaacagct ctacagcttc ctggagcgcc actcgcceta	21300
	cttccgcagc cacagtgcgc agattaggag cgccacttct tttgtcact tgaaaaacat	21360
	gtaaaaataa tgtactagag acactttcaa taaaggcaaa tgcttttatt tgtacactct	21420
	cgggtgatta ttacccccca cccttgccgt ctgcgccgtt taaaaatcaa aggggttctg	21480
	ccgcgcacgc ctatgcgcca ctggcaggga cacgttgcca tactggtgtt tagtgctcca	21540
	cttaaaactca ggcacaacca tccgcggcag ctcggtgaag ttttcactcc acaggtgcg	21600
	caccatcacc aacgcgttta gcaggtcggg cgccgatatc ttgaagtcgc agttggggcc	21660

	tccgccctgc gcgcgcgagt tgcgatacac agggttgcag cactggaaca ctatcagcgc	21720
	cggttggtgc acgctggcca gcacgtcttt gtcggagatc agatccgcgt ccaggtcctc	21780
	cgcgttgctc agggcgaaacg gagtcaactt tggtagctgc cttcccaaaa agggcgcgctg	21840
	cccaggtttt gatttgcact cgcaccgtag tggcatcaaa aggtgaccgt gcccggctctg	21900
	ggcgtagga tacagcgctt gcataaaagc cttgatctgc ttaaaagcca cctgagcctt	21960
	tgcgccttca gagaagaaca tgccgcaaga cttgccggaa aactgattgg ccggacaggc	22020
[0036]	cgcgctgctc acgcagcacc ttgcgtcggt gttggagatc tgcaccacat ttcggcccca	22080
	ccggttcttc acgatcttgg ccttgctaga ctgctcttc agcgcgcgct gcccgttttc	22140
	gctcgtcaca tccatttcaa tcacgtgctc cttatttatc ataatgcttc cgtgtagaca	22200
	cttaagctcg ccttcgatct cagcgcgagc gtgcagccac aacgcgcagc ccgtgggctc	22260
	gtgatgcttg taggtcacct ctgcaaacga ctgcaggtac gcctgcagga atcgcccat	22320
	catcgtcaca aaggtcttgt tgctgggtgaa ggtagctgc aaccgcgggt gctctctgtt	22380
	cagccaggtc ttgcatacgg ccgccagagc ttccacttgg tcaggcagta gtttgaagtt	22440

	cgccctttaga tcgttatcca cgtggtactt gtccatcagc gcgcgcgcag cctccatgcc	22500
	cttctccac gcagacacga tcggcacact cagcgggttc atcacgtaa tttcactttc	22560
	cgcttcgtg ggctcttcct cttcctcttg cgtccgcata ccacgcgcca ctgggtcgtc	22620
	ttcattcagc cgccgcactg tgcgcttacc tcctttgcca tgcttgatta gcaccggtgg	22680
	gttgctgaaa cccaccattt gtagcgccac atcttctctt tcttcctcgc tgtccacgat	22740
	tacctctggt gatggcgggc gctcgggctt gggagaaggc cgcttctttt tcttcttggg	22800
[0037]	cgcaatggcc aaatccgccg ccgaggtcga tggccgcggg ctgggtgtgc gcggcaccag	22860
	cgcgcttgt gatgagtctt cctcgtctc ggactcgata cgccgcctca tccgcttttt	22920
	tgggggcgcc cggggaggcg gcggcgacgg ggacggggac gacacgtcct ccatggttgg	22980
	gggacgtcgc gccgcaccgc gtccgcgtc gggggtggtt tcgcgtgct cctcttcccg	23040
	actggccatt tccttctcct ataggcagaa aaagatcatg gagtcatcg agaagaagga	23100
	cagcctaacc gccccctctg agttcgccac caccgcctcc accgatgcc ccaacgcgcc	23160
	taccaccttc ccgctcagg caccctcgct tgaggaggag gaagtgatta tcgagcagga	23220

	cccaggtttt gtaagcgaag acgacgagga ccgctcagta ccaacagagg ataaaaagca	23280
	agaccaggac aacgcagagg caaacgagga acaagtcggg cggggggacg aaaggcatgg	23340
	cgactaccta gatgtgggag acgacgtgct gttgaagcat ctgcagcgcc agtgcgccat	23400
	tatctgcgac gcgttgcaag agcgcagcga tgtgcccctc gccatagcgg atgtcagcct	23460
	tgcctacgaa cgccacctat tctcaccgcg cgtaccccc aaacccaag aaaacggcac	23520
	atgcgagccc aaccgcgccc tcaacttcta ccccgatatt gccgtgccag aggtgcttgc	23580
[0038]	cacctatcac atctttttcc aaaactgcaa gataccccta tctgccgtg ccaaccgcag	23640
	ccgagcggac aagcagctgg ccttgcgga gggcgctgtc atacctgata tcgcctcgct	23700
	caacgaagtg ccaaaaatct ttgagggtct tggacgcgac gagaagcgcg cggcaaacgc	23760
	tctgcaacag gaaaacagcg aaaatgaaag tcaactctgga gtgttggtgg aactcgaggg	23820
	tgacaacgcg cgcctagccg tactaaaacg cagcatcgag gtcacccact ttgcctaccc	23880
	ggcacttaac ctacccccca aggtcatgag cacagtcatg agtgagctga tcgtgcgccg	23940
	tgcgcagccc ctggagaggg atgcaaattt gcaagaacaa acagaggagg gcctaccgcg	24000

	agttggcgac gacgagctag cgcgctggct tcaaacgcgc gagcctgccg acttggagga	24060
	gcgacgcaaa ctaatgatgg ccgcagtgtc cgttaccgtg gagcttgagt gcatgcagcg	24120
	gttctttgct gacccggaga tgcagcgcaa gctagaggaa acattgcact acacctttcg	24180
	acagggttac gtacgccagg cctgcaagat ctccaacgtg gagctctgca acctggtctc	24240
	ctaccttgga attttgcacg aaaaccgcct tgggcaaaac gtgcttcatt ccacgtcaa	24300
	gggcgaggcg cgccgcgact acgtccgcga ctgcgtttac ttatttctat gctacacctg	24360
[0039]	gcagacggcc atgggcgttt ggcagcagtg cttaggaggag tgcaacctca aggagctgca	24420
	gaaactgcta aagcaaaact tgaaggacct atggacggcc ttcaacgagc gctccgtggc	24480
	cgcgcaactg gcggacatca ttttccccga acgcctgctt aaaaccctgc aacagggtct	24540
	gccagacttc accagtcaaa gcatgttgca gaactttagg aactttatcc tagagcgctc	24600
	aggaatcttg cccgccacct gctgtgcact tcctagcgac ttgtgcca ttaagtaccg	24660
	cgaatgcct ccgcgcttt ggggccactg ctaccttctg cagctagcca actaccttgc	24720
	ctaccactct gacataatgg aagacgtgag cggtgacggt ctactggagt gtcactgtcg	24780

	ctgcaaccta tgcaccccgcc accgctccct ggtttgcaat tgcagctgc ttaacgaaag	24840
	tcaaattatc ggtacctttg agctgcaggg tccctcgctt gacgaaaagt ccgcggtcc	24900
	ggggttgaaa ctcaactcgg ggctgtggac gtcggcttac cttcgcaaatt ttgtacctga	24960
	ggactaccac gccacgaga ttaggttcta cgaagaccaa tcccgcccgcc ctaatgcgga	25020
	gcttaccgcc tgcgtcatta ccagggcca cattcttggc caattgcaag ccatcaacaa	25080
	agcccgccaa gagtttctgc tacgaaaggg acgggggggtt tacttggacc ccagtcgga	25140
[0040]	cgaggagctc aaccaatcc ccccgccgcc gcagccctat cagcagcagc cgcgggacct	25200
	tgcttcccag gatggcacc aaaaagaagc tgcagctgcc gccgccacc acggacgagg	25260
	aggaatactg ggacagtcag gcagaggagg ttttggacga ggaggaggag gacatgatgg	25320
	aagactggga gacctagac gaggaagctt ccgaggtcga agaggtgtca gacgaaacac	25380
	cgtcacccctc ggtcgcatc cctcgccgg cgcgccagaa atcggaacc ggttcagca	25440
	tggtacaac ctccgtcct caggcgccgc cggcactgcc cgttcgccga cccaaccgta	25500
	gatgggacac cactggaacc agggccggtta agtccaagca gccgccgccc ttagcccaag	25560

	agcaacaaca gcgccaaggc taccgtcat ggcgcgggca caagaacgcc atagttgctt	25620
	gcttgcaaga ctgtgggggc aacatctcct tcgcccgcgc ctttcttctc taccatcacg	25680
	gcgtggcctt ccccgtaac atcctgcatt actaccgtca tctctacagc ccatactgca	25740
	ccggcggcag cggcagcaac agcagcggcc acacagaagc aaaggcgacc ggatagcaag	25800
	actctgacaa agcccaagaa atccacagcg gcggcagcag caggaggagg agcgtgcgt	25860
	ctggcgccca acgaaccgt atcgaccgc gagcttagaa acaggatitt tccactctg	25920
[0041]	tatgtatat ttcaacagag caggggcca gaacaagagc tgaaaataaa aaacaggtct	25980
	ctgcgatecc tcaccgcag ctgcctgtat cacaaaagcg aagatcagct tcggcgcacg	26040
	ctggaagacg cggaggtct cttcagtaaa tactgcgcgc tgactcttaa ggactagitt	26100
	cgcgcccttt ctcaaattta agcgcgaaaa ctacgtcatc tccagcggcc acaccggcg	26160
	ccagcacctg ttgtcagcgc cattatgagc aaggaaattc ccacgcccta catgtggagt	26220
	taccagccac aaatgggact tgcggtgga gctgcccaag actactcaac ccgaataaac	26280
	tacatgagcg cgggaccca catgatatcc cgggtcaacg gaatacgcgc ccaccgaaac	26340

	cgaattctcc tggaacaggc ggctattacc accacacctc gtaataacct taatccccgt	26400
	agttggcccg ctgccctggt gtaccaggaa agtcccgtc ccaccactgt ggtacttccc	26460
	agagacgccc aggccgaagt tcagatgact aactcagggg cgcagcttgc gggcggtttt	26520
	cgtcacaggg tgcggtcgcc cgggcagggt ataactcacc tgacaatcag agggcgaggt	26580
	attcagctca acgacgagtc ggtgagctcc tcgcttggtc tccgtccgga cgggacattt	26640
	cagatcggcg gcgccggccg ctcttcattc acgcctcgtc aggcaatcct aactctgcag	26700
[0042]	acctcgctct ctgagccgcg ctctggaggc attggaactc tgcaatttat tgaggagttt	26760
	gtgccatcgg tctactttaa ccccttctcg ggacctcccg gccactatcc ggatcaattt	26820
	attcctaact ttgacgcggt aaaggactcg gcggacggct acgactgaat gttaagtgga	26880
	gaggcagagc aactgcgcct gaaacacctg gtccactgtc gccgccacaa gtgctttgcc	26940
	cgcgactccg gtgagttttg ctactttgaa ttgcccgagg atcatatcga gggcccggcg	27000
	cacggcgtec ggcttaccgc ccagggagag ctigcccgtg gcctgattcg ggagtttacc	27060
	cagcgcctcc tgctagtga gcgggacagg ggacctgtg ttctcactgt gatttgcaac	27120

	tgtcctaacc ctggattaca tcaagatcct ctagttaatg tcaggtcgcc taagtcgatt	27180
	aactagagta cccggggatc ttattccctt taactaataa aaaaaataa taaagcatca	27240
	cttacttaaa atcagtttagc aaatttctgt ccagtttatt cagcagcacc tccttgcctt	27300
	cctcccagct ctggatttgc agcttcctcc tggtcgcaaa ctttctccac aatctaaatg	27360
	gaatgtcagt ttctctctgt tctgtccat ccgcacccac tatcttcatg ttgttcgaga	27420
	tgaagcgcgc aagaccgtct gaagatacct tcaaccccggt gtatccatat gacacggaaa	27480
[0043]	ccggtcctcc aactgtgcct tttcttactc ctccccttgt atccccaat gggtttcaag	27540
	agagtccccc tgggttactc tctttgcgcc tatecgaacc tctagttacc tccaatggca	27600
	tgcttgcgct caaatgggc aacggcctct ctctggacga ggccggcaac cttacctccc	27660
	aaaatgtaac cactgtgagc ccacctctca aaaaaaccaa gtcaaacata aacctggaaa	27720
	tatctgcacc cctcacagtt acctcagaag ccctaactgt ggctgccgcc gcacctctaa	27780
	tggtcgcggg caacacactc accatgcaat cacaggcccc gctaaccgtg cacgactcca	27840
	aacttagcat tgccacccaa ggaccctctc cagtgtcaga aggaaagcta gccctgcaaa	27900

	catcaggccc cctcaccacc accgatagca gtacccttac tatcactgcc tcacccctc	27960
	taactactgc cactggtagc ttgggcattg acttgaaaga gccatttat acacaaaatg	28020
	gaaaactagg actaaagtac ggggtcctt tgcatgtaac agacgaccta aacactttga	28080
	ccgtagcaac tgggtccaggt gtgactatta ataatacttc cttgcaaact aaagttactg	28140
	gagccttggg ttttgattca caaggcaata tgcaactta ttagcagga ggactaagga	28200
	ttgattctca aaacagacgc cttatacttg atgttagtta tccgtttgat gctcaaaacc	28260
[0044]	aactaaatct aagactagga cagggccctc tttttataaa ctgagccac aacttggata	28320
	ttaactacaa caaagcctt tacttgitta cagcttcaaa caattccaaa aagcttgagg	28380
	ttaacctaag cactgccaag gggttgatgt ttgacgtac agccatagcc attaatgcag	28440
	gagatgggct tgaatttggc tcacctaag caccaaacac aaatcccctc aaaacaaaaa	28500
	ttggccatgg cctagaattt gattcaaaca aggctatggt tcctaaacta ggaactggcc	28560
	ttagttttga cagcacaggt gccattacag taggaacaa aaataatgat aagctaactt	28620
	tgtggaccac accagctcca tctcctaact gtagactaaa tgcagagaaa gatgctaac	28680

	tcactttggt cttacaacaaa tgtggcagtc aaatacttgc tacagtttca gttttggctg	28740
	ttaaaggcag ttiggctcca atatctggaa cagttcaaag tgctcatctt attataagat	28800
	ttgacgaaaa tggagtgcta ctaaacaatt ccttcttgga ccagaatat tggaacttta	28860
	gaaatggaga tcttactgaa ggcacagcct atacaaacgc tgttggattt atgcctaacc	28920
	tatcagctta tccaaaatct cacggtaaaa ctgccaaaag taacattgtc agtcaagttt	28980
	acttaaacgg agacaaaact aaacctgtaa cactaacat tacactaac ggtacacagg	29040
[0045]	aaacaggaga cacaactcca agtgcatact ctatgtcatt ttcatgggac tggctctggcc	29100
	acaactacat taatgaaata ttggccacat cctcttacac ttttcatac attgccaag	29160
	aataaagaat cgtttgtgtt atgtttcaac gtgtttattt ttcaattgca gaaaatttca	29220
	agtcattttt cattcagtag tatagcccca ccaccacata gcttatacag atcacctac	29280
	cttaatcaaa ctacagaac cctagtattc aacctgccac ctccctccca acacacagag	29340
	tacacagtec tttctccccg gctggcctta aaaagcatca tatcatgggt aacagacata	29400
	ttcttaggtg ttatatcca cacggtttcc gtctgagcca aacgtcatc agtgatatta	29460

	ataaactccc cgggcagctc acttaagttc atgtcgctgt ccagctgtg agccacaggc	29520
	tgctgtccaa ctgtcggttg cttaacgggc ggcgaaggag aagtccacgc ctacatgggg	29580
	gtagagtcac aatcgtgcat caggataggg cggtggtgct gcagcagcgc gcgaataaac	29640
	tgctgccgcc gccgctccgt cctgcaggaa tacaacatgg cagtggcttc ctcagcgatg	29700
	attcgcaccg cccgcagcat aaggcgcctt gtctctcggg cacagcagcg caccctgac	29760
	tcacttaaat cagcacagta actgcagcac agcaccacaa tattgttcaa aatcccacag	29820
[0046]	tgcaaggcgc tgtatccaaa gtcctatggc gggaccacag aaccacgtg gccatcatac	29880
	cacaagcgca ggtagattaa gtggcgaccc ctcataaaca cgctggacat aaacattacc	29940
	tcttttggca tgttgtaatt caccacctcc cggtaccata taaacctctg attaaacatg	30000
	gcgccatcca ccaccatcct aaaccagctg gccaaaacct gcccgccggc tatacactgc	30060
	agggaaccgg gactggaaca atgacagtgg agagcccagg actcgtaacc atggatcatc	30120
	atgctcgtea tgatatcaat gttggcacia cacaggcaca cgtgcataca ctctctcagg	30180
	attacaagct cctcccgcgt tagaaccata tcccaggaa caaccattc ctgaatcagc	30240

	gtaaatecca cactgcaggg aagacctcgc acgtaactca cgttgtgcat tgtcaaagtg	30300
	ttacattcgg gcagcagcgg atgattcctcc agtatggtag cgcgggtttc tgtctcaaaa	30360
	ggaggtagac gatccctact gtacggagtg cgccgagaca accgagatcg tgttggtcgt	30420
	agtgtcatgc caaatggaac gccggacgta gtcattttc ctgaagcaaa accaggtgcg	30480
	ggcgtgacaa acagatctgc gtctccggtc tcgccgtta gatcgtctg ttagtagtt	30540
	gtagtatatc cactctctca aagcatccag gcgccccctg gcttcgggtt ctatgtaaac	30600
[0047]	tccttcatgc gccgtgccc tgataacatc caccaccgca gaataagcca caccagcca	30660
	acctacacat tcgttctgcg agtcacacac gggaggagcg ggaagagctg gaagaacct	30720
	gtttttttt ttattccaaa agattatcca aaacctcaaa atgaagatct attaatgaa	30780
	cgcgctcccc tccggtggcg tggtaaact ctacagccaa agaacagata atggcattg	30840
	taagatgttg cacaatggct tccaaaaggc aaacggccct cagttccaag tggacgtaaa	30900
	ggctaaaccc ttcagggtga atctcctcta taaacattcc agcaccttca accatgccca	30960
	aataattctc atctgccac cttctcaata tatctctaag caaatcccga atattaagtc	31020

	cggccattgt aaaaatctgc tccagagcgc cctccacctt cagcctcaag cagcgaatca	31080
	tgattgcaaa aattcaggtt cctcacagac ctgtataaga ttcaaaagcg gaacattaac	31140
	aaaaataccg cgatcccgta ggtcccttcg cagggccagc tgaacataat cgtgcaggtc	31200
	tgcacggacc agcgcggcca cttccccgcc aggaaccatg acaaaagaac ccacactgat	31260
	tatgacacgc atactcggag ctatgctaac cagcgtagcc ccgatgtaag cttgttgcat	31320
	gggcggcgat ataaaatgca aggtgctgct caaaaaatca ggcaaagcct cgcgcaaaaa	31380
[0048]	agaaagcaca tcgtagtcat gtcctgcag ataaaggcag gtaagctccg gaaccaccac	31440
	agaaaaagac accatttttc tctcaaacat gtctgcgggt ttctgcataa acacaaaata	31500
	aaataacaaa aaaacattta aacattagaa gcctgtctta caacaggaaa aacaaccctt	31560
	ataagcataa gacggactac ggccatgccg gcgtgaccgt aaaaaaactg gtcaccgtga	31620
	ttaaaaagca ccaccgacag ctctcggtc atgtccggag tcataatgta agactcggta	31680
	aacacatcag gttgattcac atcggtcagt gctaaaaagc gaccgaaata gcccggggga	31740
	atacataccc gcaggcgtag agacaacatt acagccccc taggaggtat aacaaaatta	31800

	ataggagaga aaaacacata aacacctgaa aaaccctcct gcctaggcaa aatagcacc	31860
	tcccgtcca gaacaacata cagcgcttcc acagcggcag ccataacagt cagccttacc	31920
	agtaaaaaag aaaacctatt aaaaaaacac cactcgacac ggcaccagct caatcagtca	31980
	cagtgtaaaa aaggccaag tgcagagcga gtatatatag gactaaaaaa tgacgtaacg	32040
	gttaaagtcc aaaaaaaca cccagaaaac cgcacgcgaa cctacgccca gaaacgaaag	32100
	ccaaaaaacc cacaacttcc tcaaatcgtc acttcggtt tcccacgtta cgtcacttcc	32160
[0049]	cattttaaga aaactacaat tcccaacaca tacaagttac tccgccctaa aacctacgtc	32220
	acccgccccg ttcccacgcc ccgcgccacg tcacaaactc caccacctca ttatcatatt	32280
	ggcttcaatc caaaataagg tatattattg atgat	32315

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 4

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu

1 5

<210> 5

<211> 1826

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

[0050]

cgctccacct ctcaagcagc cagcgctgc ctgaatctgt tctgccccct cccacccat 60

ttcaccacca ccatgacacc gggcaccag tctcctttct tectgetget getcctcaca 120

gtgcttacag ttgttacggg ttctggtcat gcaagctcta cccaggtgg agaaaaggag 180

acttcggcta ccagagaag ttcagtccc agctctactg agaagaatgc tgtgagtatg 240

accagcagcg tactctccag ccacagcccc ggttcaggt cctccaccac tcaggacag 300

gatgtcactc tggccccggc cacggaacca gttcaggtt cagctgccac ctggggacag 360

gatgtcacct cggteccagt caccaggcca gccctgggct ccaccacccc gccagccac 420

	gatgtcacct cagccccgga caacaagcca gccccgggct ccaccgcccc cccagcccac	480
	ggtgtcacct cggccccgga caccaggcgg gccccgggct ccaccgcccc cccagcccac	540
	ggtgtcacct cggccccgga caacaggccc gccttgggct ccaccgcccc tccagtccac	600
	aatgtcacct cggcctcagg ctctgcatca ggctcagctt ctactctggt gcacaacggc	660
	acctctgcca gggctaccac aaccccagcc agcaagagca ctccattctc aattcccagc	720
	caccactctg atactcctac cacccttgcc agccatagca ccaagactga tgccagtagc	780
[0051]	actcaccata gcacgtacc tctctcacc tctccaatc acagcattc tccccagttg	840
	tctactgggg tctctttctt tttctgtct tttcacattt caaacctcca gtttaattcc	900
	tctctggaag atcccagcac cgactactac caagagctgc agagagacat ttctgaaatg	960
	ttttgcaga ttataaaca aggggggttt ctgggcctct ccaatattaa gttcaggcca	1020
	ggatctgtgg tggtaaat gactctggcc ttccgagaag gtaccatcaa tgtccacgac	1080
	gtggagacac agttcaatca gtataaaacg gaagcagcct ctcgatataa cctgacgac	1140
	tcagacgtca gcgtgagtga tgtgccattt cttttctctg cccagtctgg ggctgggggtg	1200

	ccaggctggg gcatcgcgct gctggtgctg gtctgtgttc tggttgcgct ggccattgtc	1260
	tatctcattg ccttggctgt ctgtcagtgc cgccgaaaga actacgggca gctggacatc	1320
	tttccagccc gggataccta ccatcctatg agcgagtacc ccacctacca caccatggg	1380
	cgctatgtgc cccctagcag taccgatcgt agcccctatg agaaggtttc tgcaggtaat	1440
	ggtggcagca gcctctctta cacaaccca gcagtggcag ccacttctgc caacttgtag	1500
	gggcacgtcg cccgctgagc tgagtggcca gccagtgcc ttccactcca ctcaggttct	1560
[0052]	tcagggccag agcccctgca ccctgtttgg gctggtgagc tgggagtta ggtgggctgc	1620
	tcacagcctc cttcagaggc cccaccaatt tctcggacac ttctcagtgt gtggaagctc	1680
	atgtgggccc ctgagggtc atgcctggga agtgttgtgg tgggggctcc caggaggact	1740
	ggcccagaga gccctgagat agcggggatc ctgaactgga ctgaataaaa cgtggtctcc	1800
	cactgcgcca aaaaaaaaaa aaaaaa	1826

<210> 6

<211> 1826

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 6

	cgctccacct ctcaagcagc cagcgccctgc ctgaatctgt tctgccccct cccaccccat	60
	ttcaccacca ccatgacacc gggcaccacag tctcctttct tctgtctgct gctcctcaca	120
	gtgcttacag ttgttacggg ttctggtcac gcaagctcta cccaggtgg agaaaaggag	180
[0053]	acttcggcta cccagagaag ttcagtcccc agctctactg agaagaatgc tgtgagtatg	240
	accagcagcg tactctccag ccacagcccc gggtcaggtt cctccaccac tcaggacacg	300
	gatgtcactc tggccccggc cacggaacca gcttcaggtt cagctgcctt ttggggacag	360
	gatgtcacct cggctcccagt caccaggcca gccctgggct ccaccacccc gccagcccac	420
	gatgtcacct cagccccgga caacaagcca gccccgggct ccaccgcccc cccagcccac	480
	gggtgtcacct cgtatcttga caccaggccg gccccggttt atcttgcccc cccagcccat	540
	gggtgtcacct cggccccgga caacaggccc gccttgggct ccaccgcccc tccagtccac	600

	aatgtcacct cggcctcagg ctctgcatca ggctcagctt ctactctggt gcacaacggc	660
	acctctgcca gggctaccac aaccccagcc agcaagagca ctccattctc aattcccagc	720
	caccactctg atactectac cacccttgcc agccatagca ccaagactga tgccagtagc	780
	actcaccata gcacggtacc tctctcacc tctccaatc acagcattc tcccagttg	840
	tctactgggg tctctttctt tttctgtct tttcacattt caaacctcca gtttaattcc	900
	tctctggaag atcccagcac cgactactac caagagctgc agagagacat ttctgaaatg	960
[0054]	tttttcgaga ttataaaca agggggtttt ctgggcctct ccaatattaa gttcaggcca	1020
	ggatctgtgg tggtaaat gactctggcc ttccgagaag gtacatcaa tgtccacgac	1080
	gtggagacac agttcaatca gtataaaacg gaagcagcct ctcgatataa cctgacgac	1140
	tcagacgtca gcgtgagtga tgtgccattt ctttctctg ccagctctgg ggctggggtg	1200
	ccaggtctgg gcacgcgct gctggtgctg gctgtgttc tggtttatct ggccattgtc	1260
	tatctcattg ccttggtgtg cgctcaggtt cgccgaaaga actacgggca gctggacatc	1320
	tttccagccc gggataaata ccacctatg agcgagtacg ctctttacca cacccatggg	1380

	cgctatgtgc cccctagcag tcttttccgt agcccctatg agaaggtttc tgcaggtaat	1440
	ggtggcagct atctctctta cacaaaccca gcagtggcag ccgcttctgc caacttgtag	1500
	gggcacgtcg cccgtgagc tgagtggcca gccagtgccca ttccactcca ctcaggttct	1560
	tcagggccag agcccctgca ccctgtttgg gctggtgagc tgggagtcca ggtgggctgc	1620
	tcacagcctc cttcagaggc cccaccaatt tctcggacac ttctcagtgt gtggaagctc	1680
	atgtgggccc ctgagggtc atgcctggga agtgtttgtg tgggggctcc caggaggact	1740
[0055]	ggcccagaga gccctgagat agcggggatc ctgaactgga ctgaataaaa cgtggtctcc	1800
	cactgcgcca aaaaaaaaaa aaaaaa	1826

<210> 7

<211> 2500

<212> DNA

<213> 智人

<400> 7

ggaggacact tctcagaagg ggttgttttg cttttgctta tttccgtcca ttccctctc 60

tgcgcgcgga ccttcctttt ccagatgggtg agagccgcgg ggacacccga cgccggggca 120

	ggctgatcca cgatcctggg tgtgcgtaac gccgcctggg gctccgtggg cgagggacgt	180
	gtggggacag gtgcaccgga aactgccaga ctggagagtt gaggcatcgg aggcgcgaga	240
	acagcactac tactgcggcg agacgagcgc ggcgcatccc aaagcccggc caaatgcgct	300
	cgtccctggg aggggaggga ggcgcgctg gagcggggac agtcttggtc cgcgccctcc	360
	tcccgggtct gtgccgggac ccgggacccg ggagccgtcg caggctcagg tccaaggggc	420
	cccttttctc ggaaggcgcg cgccaagag cagggaaggt ggatctcagg tagcgagtct	480
[0056]	gggcttcggg gacggcgggg aggggagccg gacgggagga tgagctccc tggcaccgag	540
	agcgcgggaa agagcctgca gtaccgagtg gaccacctgc tgagcgccgt ggagaatgag	600
	ctgcaggcgg gcagcgagaa gggcgacccc acagagcgcg aactgcgctg gggcctggag	660
	gagagcgagc tgtggctgcg cttcaaggag ctcaccaatg agatgatcgt gaccaagaac	720
	ggcaggagga tgtttccggt gctgaagtg aacgtgtctg gcctggacct caacccatg	780
	tactccttcc tgctggactt cgtggcgcg gacaaccacc gctggaagta cgtgaacggg	840
	gaatgggtgc cggggggcaa gccggagccg caggcgccca gctgcgtcta catccacccc	900

	gactcgccca acttcggggc ccactggatg aaggctcccg tctccttcag caaagtcaag	960
	ctcaccaaca agctcaacgg agggggccag atcatgtcga actccttgca taagtatgag	1020
	cctcgaatcc acatagttag agttgggggt ccacagcgca tgatcaccag ccactgtctc	1080
	cctgagaccc agttcatagc ggtgactgct tatcagaacg aggagatcac agctcttaaa	1140
	attaagtaca atccatttgc aaaagctttc cttgatgcaa aggaaagaag tgatcacaaa	1200
	gagatgatgg aggaaccgg agacagccag caacctgggt actcccaatg ggggtggctt	1260
[0057]	cttcctggaa ccagcacct gtgtccacct gcaaattctc atctcagtt tggaggtgcc	1320
	ctctccctcc cctccacgca cagctgtgac aggtacccaa ccctgaggag ccaccggtcc	1380
	tcacctacc ccagcccta tgctcatcgg aacaattctc caacctattc tgacaactca	1440
	cctgcatgtt tatccatgct gcaatcccat gacaattggt ccagccttgg aatgcctgcc	1500
	catcccagca tgctccccgt gagccacaat gccagccac ctaccagctc cagtcagtac	1560
	cccagcctgt ggtctgtgag caacggcgcc gtcacccgg gctcccaggc agcagccgtg	1620
	tccaacgggc tgggggccca gttcttcgg ggtcctcccg cgactacac accctcacc	1680

	catccggtct cggcgccctc ttcctcggga tccccactgt acgaaggggc ggccgcggcc	1740
	acagacatcg tggacagcca gtacgacgcc gcagcccaag gccgcctcat agcctcatgg	1800
	acacctgtgt cgccaccttc catgtgaagc agcaaggccc aggtcccgaa agatgcagtg	1860
	actttttgtc gtggcagcca gtggtgactg gattgaccta ctaggtaccc agtggcagtc	1920
	tcaggttaag aaggaaatgc agcctcagta acttcctttt caaagcagtg gaggagcaca	1980
	cggcaccttt ccccagagcc ccagcatccc ttgctcacac ctgcagtagc ggtgctgtcc	2040
[0058]	caggtggett acagatgaac ccaactgtgg agatgatgca gttggcccaa cctcactgac	2100
	ggtgaaaaaa tgtttgccag ggtccagaaa ctttttttgg tttatttctc atacagtga	2160
	ttggcaactt tggcacacca gaatttgtaa actccaccag tcctacttta gtgagataaa	2220
	aagcacactc ttaatcttct tccttggtgc ttccaagtag ttagagtga gctgttaagg	2280
	acagaataaa atcatagttg aggacagcag gttttagttg aattgaaaat ttgactgctc	2340
	tgccccctag aatgtgtgta ttttaagcat atgtagctaa tctcttgtgt tgttaaacta	2400
	taactgtttc atatttttct ttgacaaag tagccaaaga caatcagcag aaagcatttt	2460

	ctgcaaaata aacgcaatat gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2500
<210>	8	
<211>	1251	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成多核苷酸	
<400>	8	
[0059]	tctagagcca ccatgagctc ccctggcacc gagagcgagg gaaagagcct gcagtaccga	60
	gtggaccacc tgctgagcgc cgtggagaat gagctgcagg cgggcagcga gaagggcgac	120
	cccacagagc gcgaactgcg cgtgggcctg gaggagagcg agctgtggct gcgcttcaag	180
	gagctcacca atgagatgat cgtgaccaag aacggcagga ggatgtttcc ggtgctgaag	240
	gtgaacgtgt ctggcctgga cccaacgcc atgtactcct tcctgctgga ctctgtggcg	300
	gcggacaacc accgctggaa gtacgtgaac ggggaatggg tgccgggggg caagccggag	360
	ccgcaggcgc ccagctgcgt ctacatccac cccgactcgc ccaacttcgg ggcccactgg	420

	atgaaggctc ccgtctcctt cagcaaagtc aagctcacca acaagctcaa cggagggggc	480
	cagatcatgc tgaactcctt gcataagtat gagcctcgaa tccacatagt gagagttggg	540
	ggtccacagc gcatgatcac cagccactgc ttccctgaga ccagttcat agcgggtgact	600
	gctagaagtg atcacaaga gatgatggag gaaccggag acagccagca acctgggtac	660
	tccaatggg ggtggcttct tcctggaacc agcaccgtgt gtccacctgc aaatcctcat	720
	cctcagtttg gaggtgccct ctccctcccc tccacgcaca gctgtgacag gtaccaacc	780
[0060]	ctgaggagcc accggtctc accctacccc agcccctatg ctcatcgga caattctcca	840
	acctattctg acaactcacc tgcatgttta tccatgtgc aatcccatga caattggtcc	900
	agccttggaa tgctgcca tcccagcatg ctccccgtga gccacaatgc cagcccacct	960
	accagctcca gtcagtacc cagcctgtgg tctgtgagca acggcgccgt caccctgggc	1020
	tcccaggcag cagccgtgtc caacgggctg ggggccagt tcttccggg ctccccgcg	1080
	cactacacac cctcaccca tccgtctcg gcgcctctt cctcgggat cccactgtac	1140
	gaagggggc cgcggccac agacatcgtg gacagccagt acgacgccg agcccaaggc	1200

cgctcatag cctcatggac acctgtgtcg ccaccttcca tgtgagatat c

1251

<210> 9

<211> 475

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 9

[0061] Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr

1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly

20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser

35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His

	50	55	60	
	Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu			
	65	70	75	80
	Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Leu Trp Gly Gln			
		85	90	95
	Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr			
[0062]	100	105	110	
	Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro			
	115	120	125	
	Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Tyr Leu Asp Thr			
	130	135	140	
	Arg Pro Ala Pro Val Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser			
	145	150	155	160

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His
165 170 175

Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu
180 185 190

Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys
195 200 205

[0063] Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr
210 215 220

Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser
225 230 235 240

Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu
245 250 255

Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu

	260	265	270
	Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu		
	275	280	285
	Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly		
	290	295	300
	Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val		
[0064]	305	310	315 320
	Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp		
	325	330	335
	Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr		
	340	345	350
	Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe		
	355	360	365

Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu
370 375 380

Val Leu Val Cys Val Leu Val Tyr Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala
385 390 395 400

Leu Ala Val Ala Gln Val Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile
405 410 415

[0065] Phe Pro Ala Arg Asp Lys Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Ala Leu Tyr
420 425 430

His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Leu Phe Arg Ser Pro
435 440 445

Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Leu Ser Tyr Thr
450 455 460

Asn Pro Ala Val Ala Ala Ala Ser Ala Asn Leu

465

470

475

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 10

Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Leu Asn Leu

[0066]

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 未知的描述: 沉默子寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8).. (8)

<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 11

tctctccna

9

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

[0067]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 12

Ala Leu Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val

1

5

10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 13

Lys Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Ala Leu

1 5 10

<210> 14

[0068] <211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 14

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val

1 5

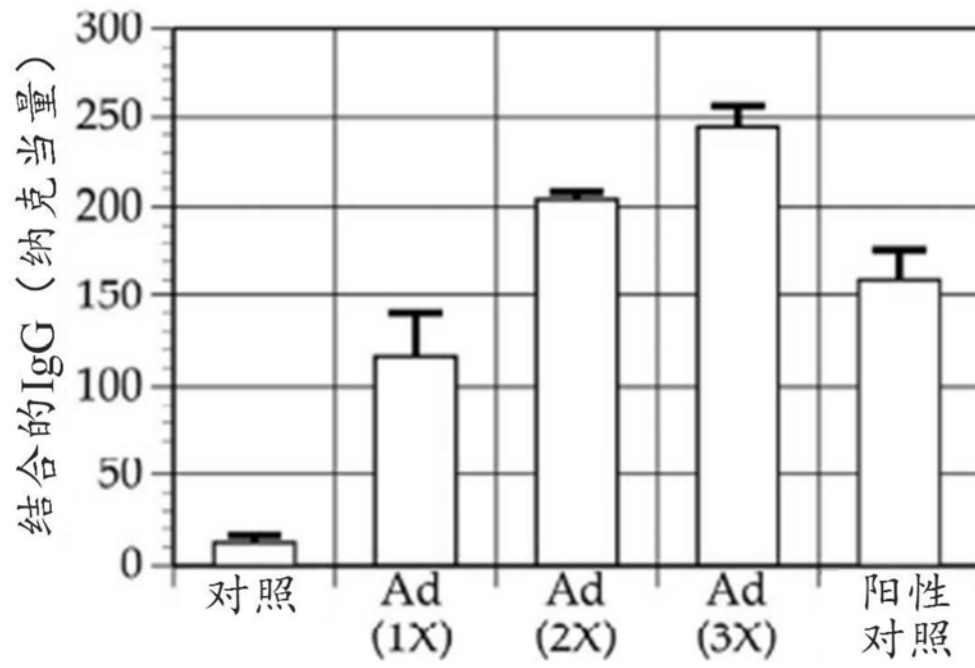


图1

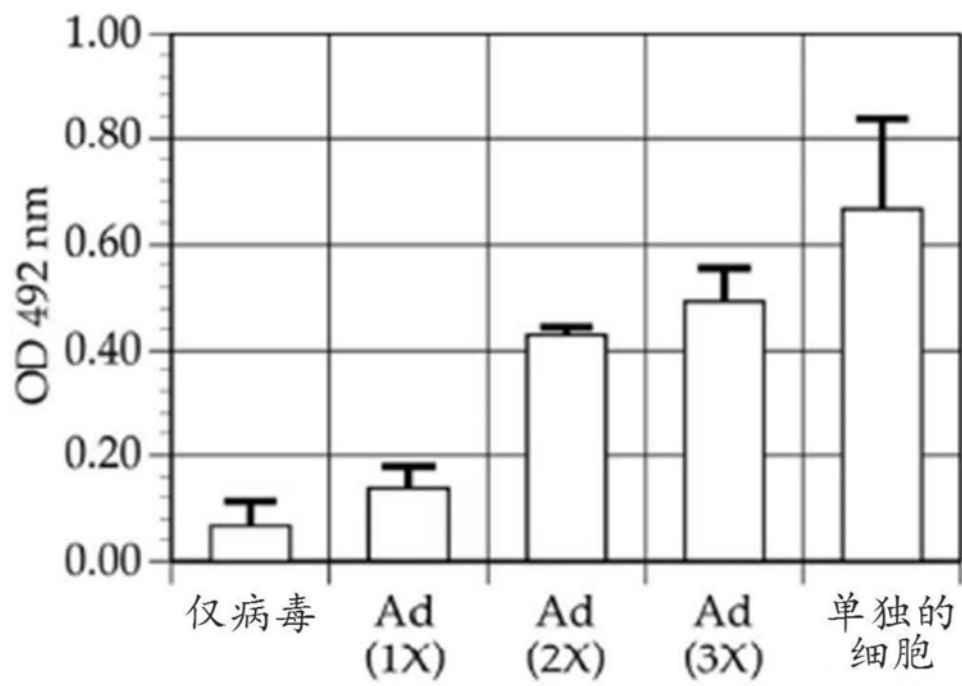


图2

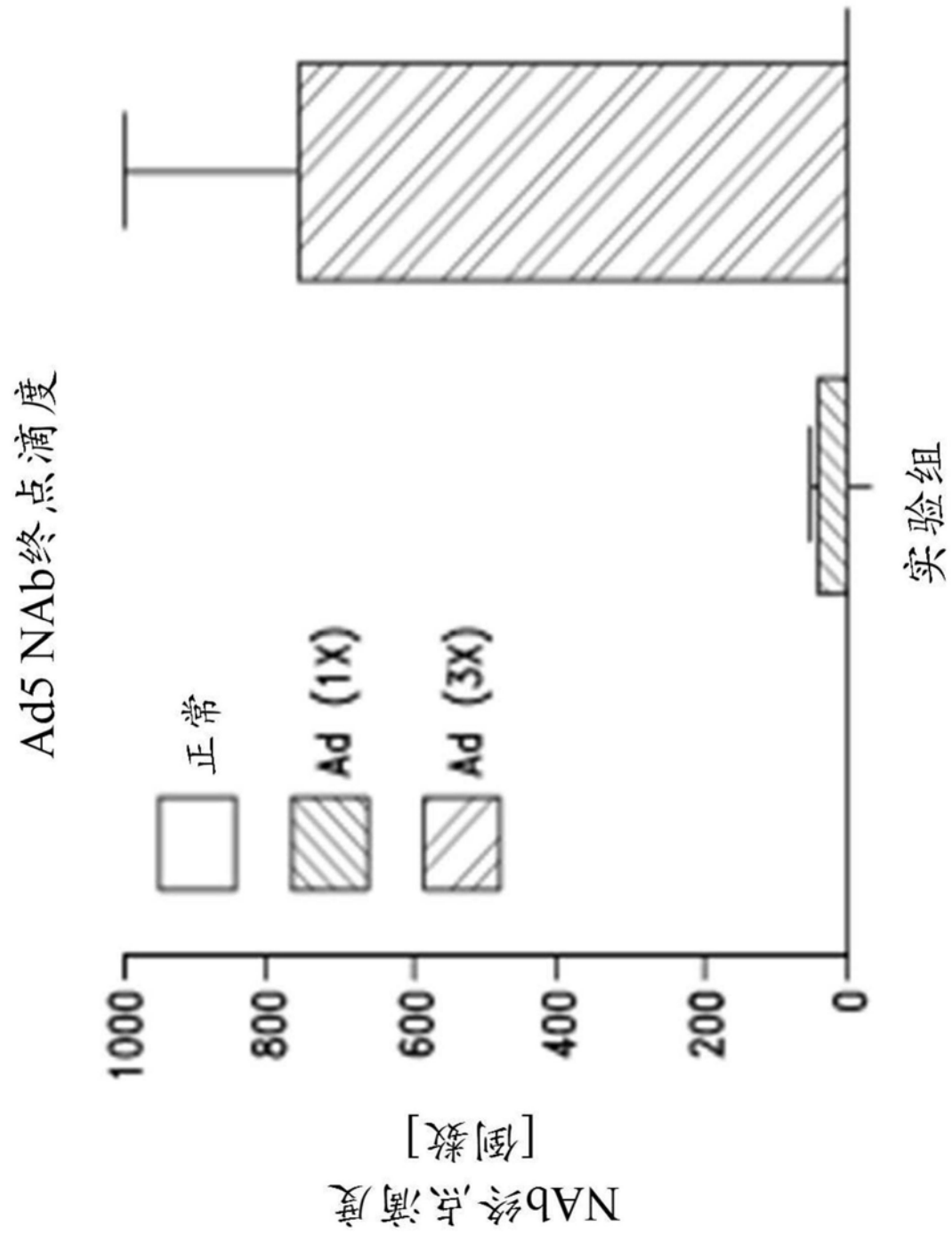


图3

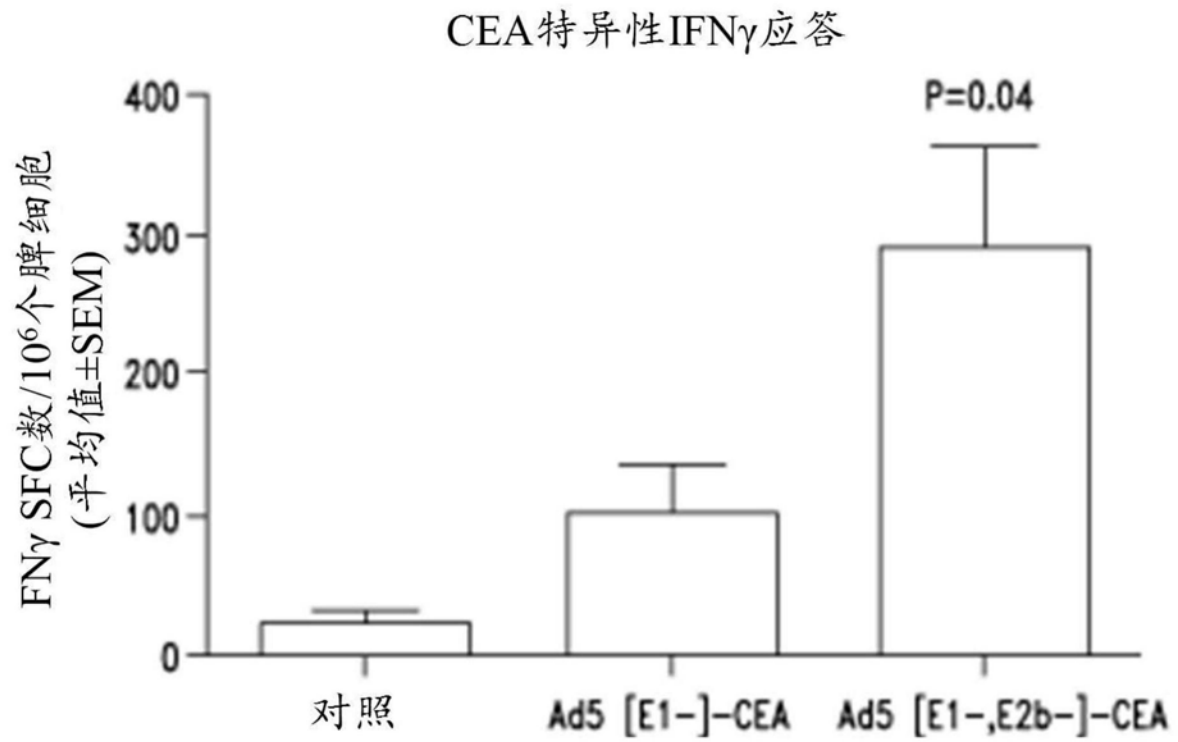


图4A

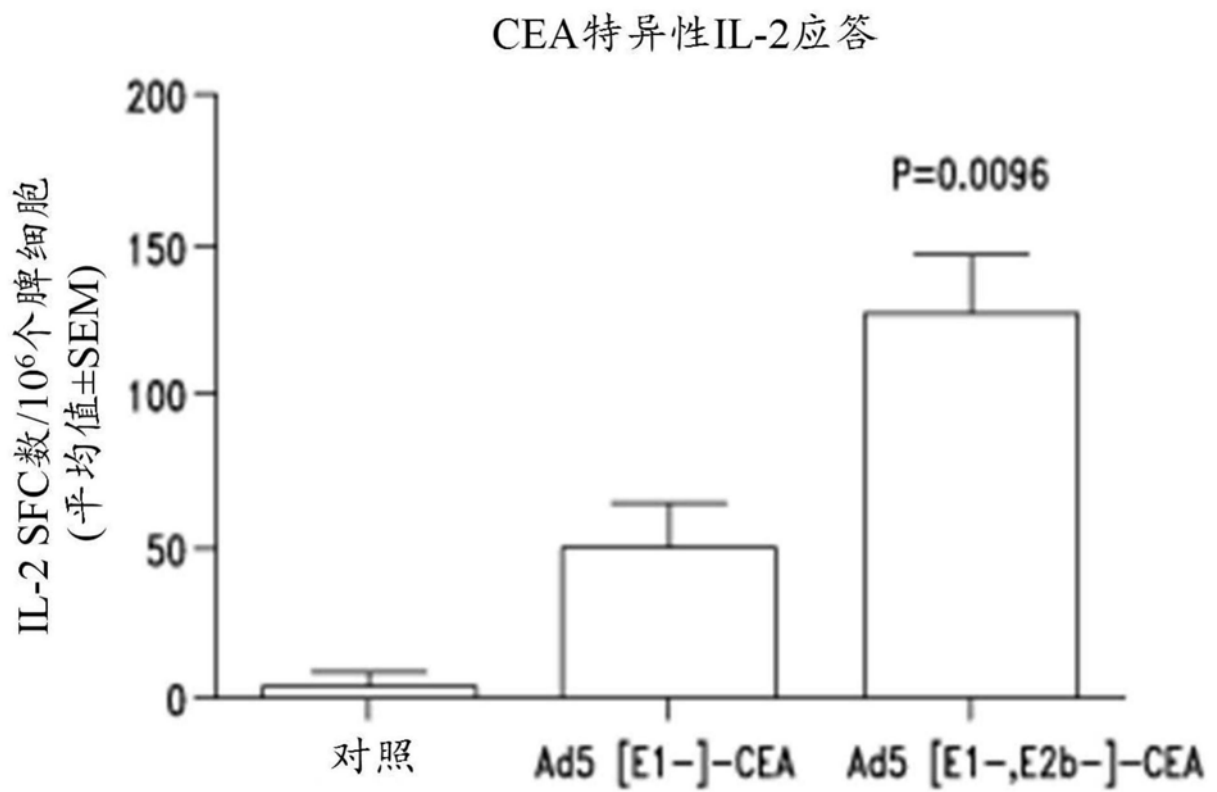


图4B

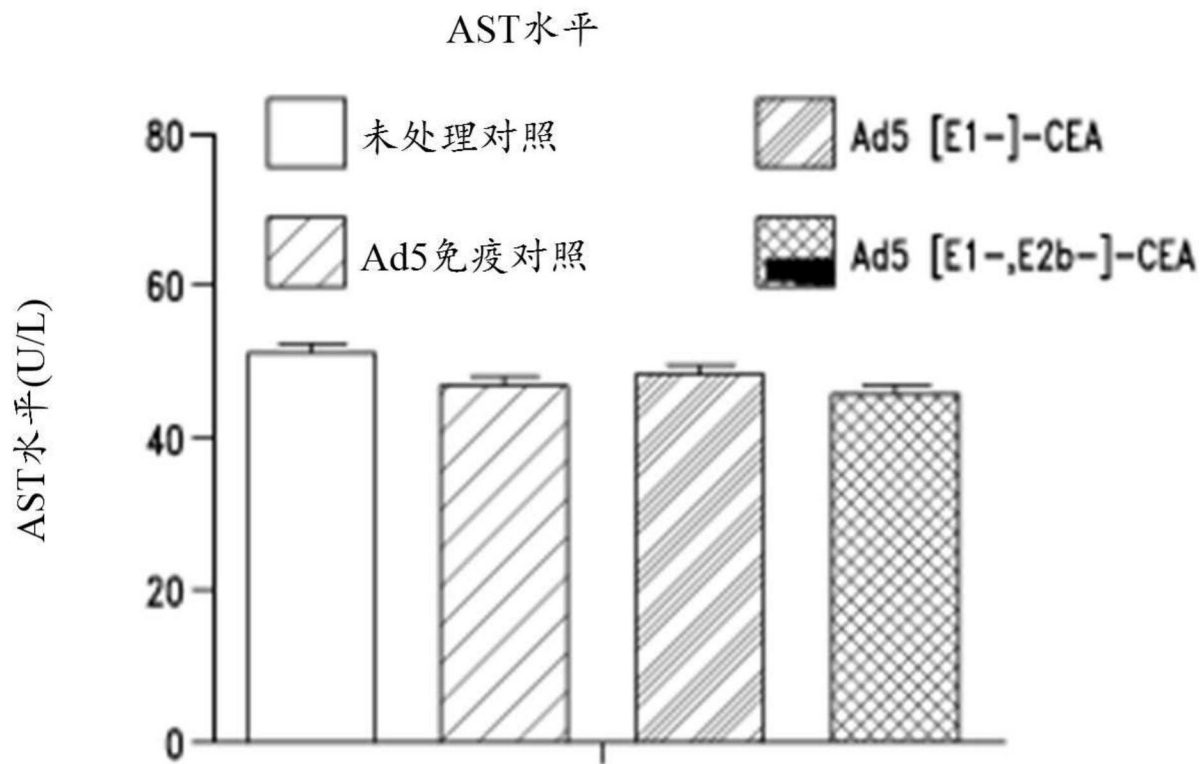


图5

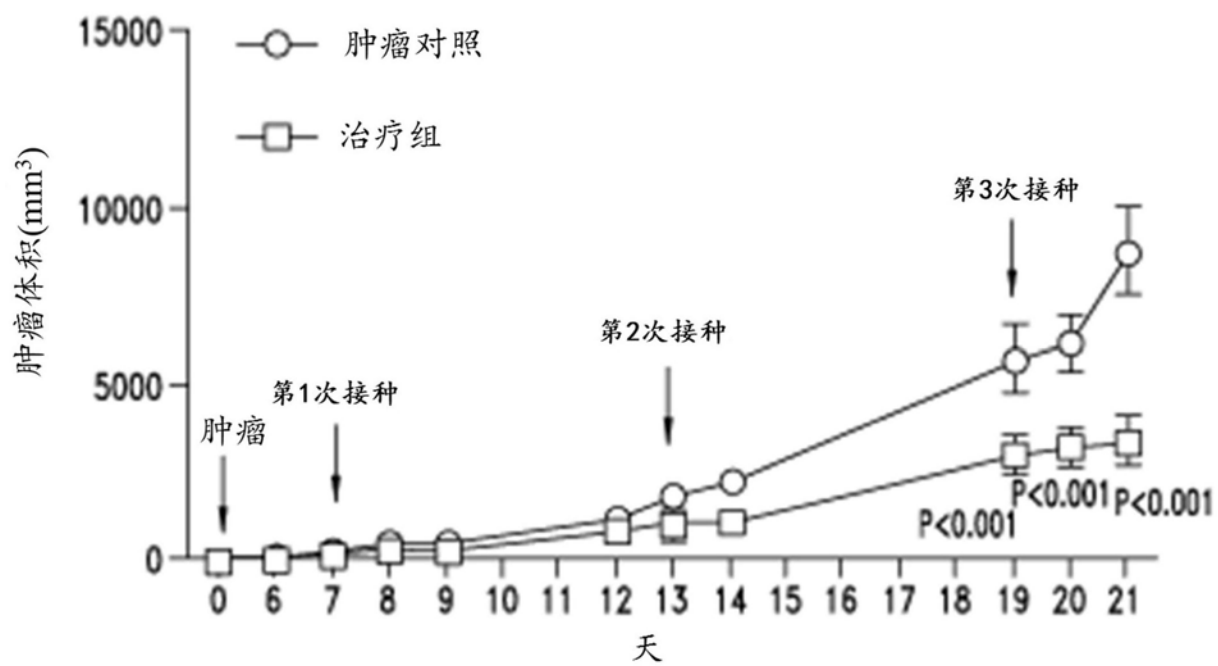


图6

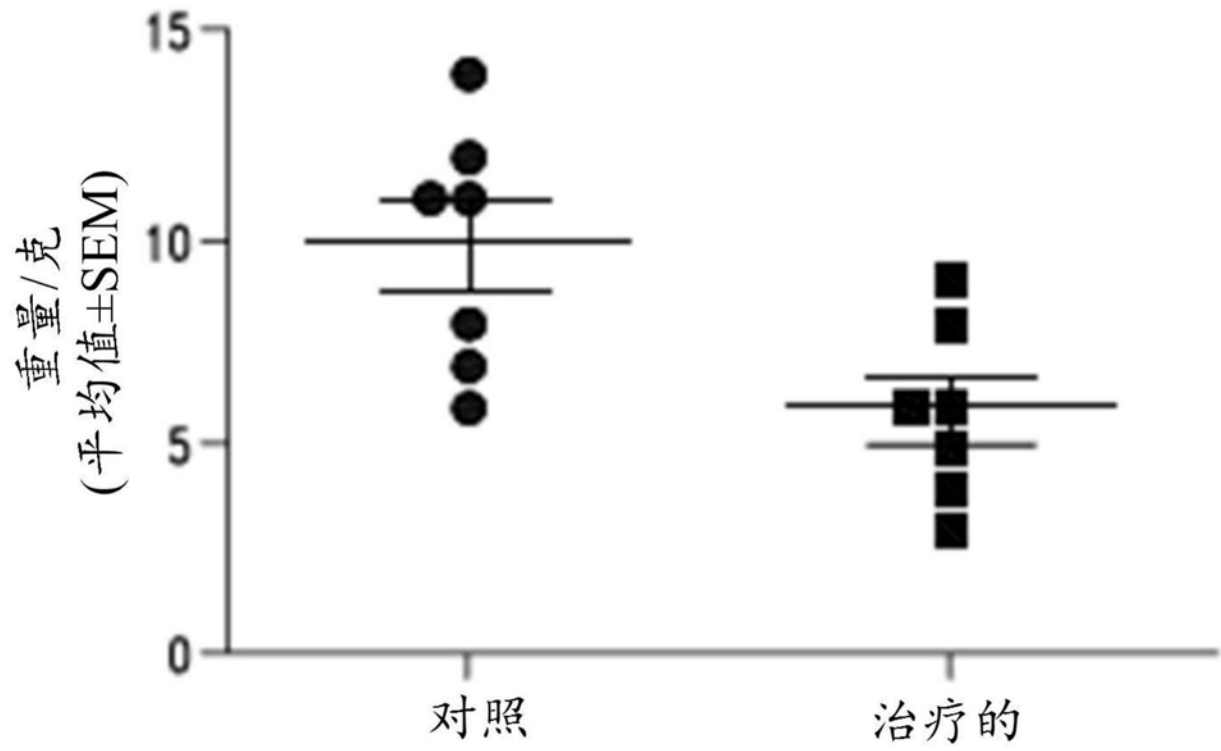


图7

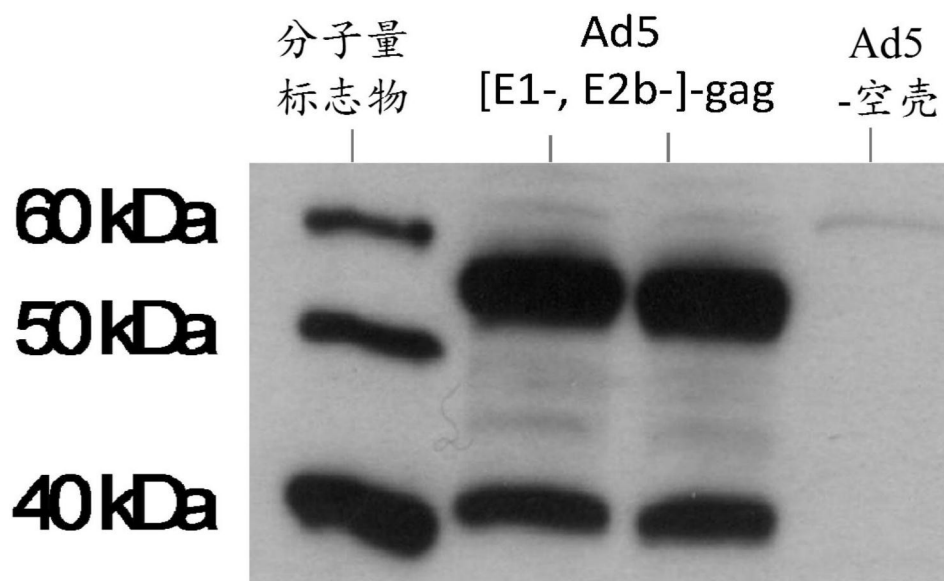


图8

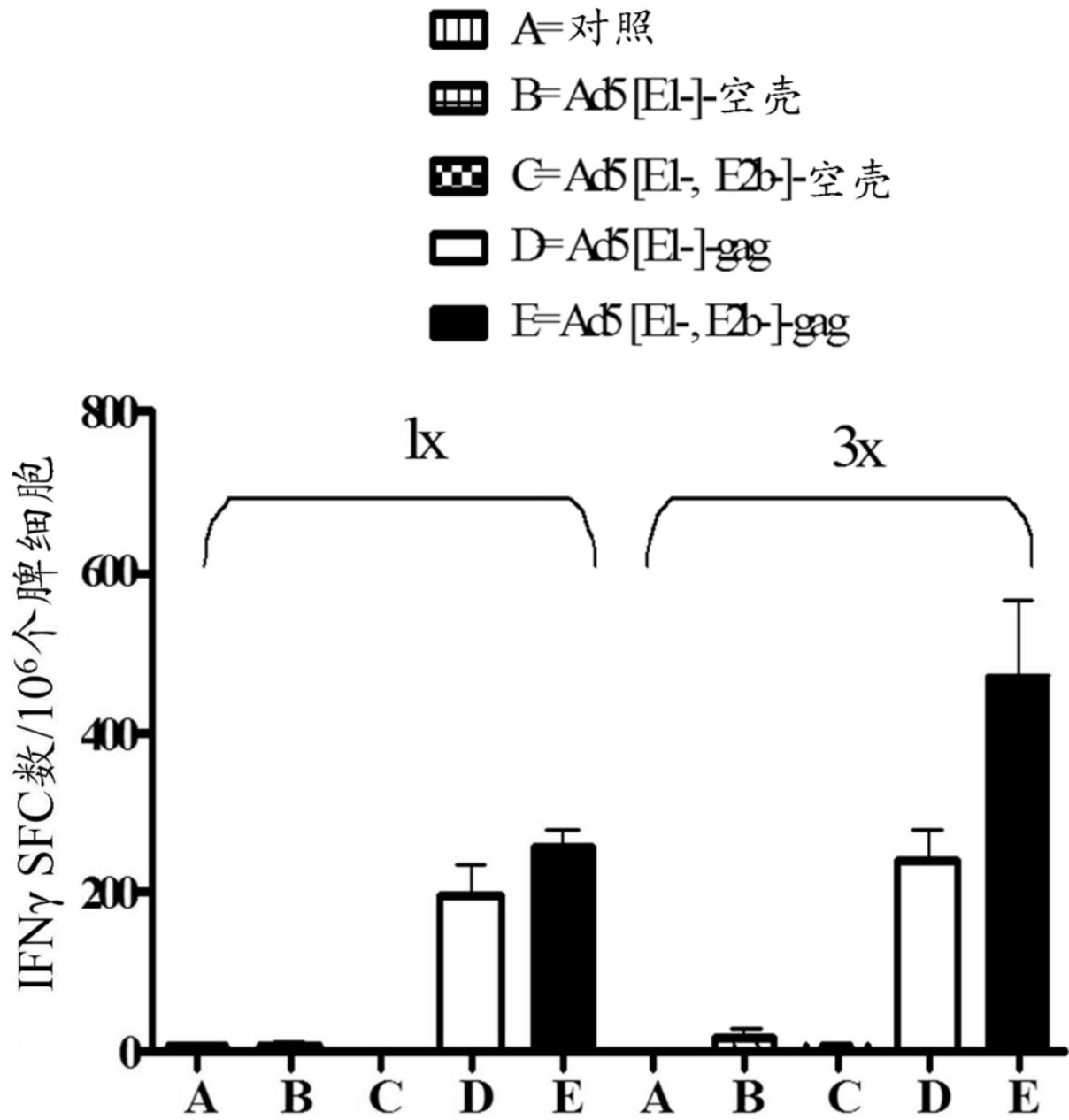


图9

Ad5免疫的NHP的Ad5-[E1-,
E2b-]-gag免疫

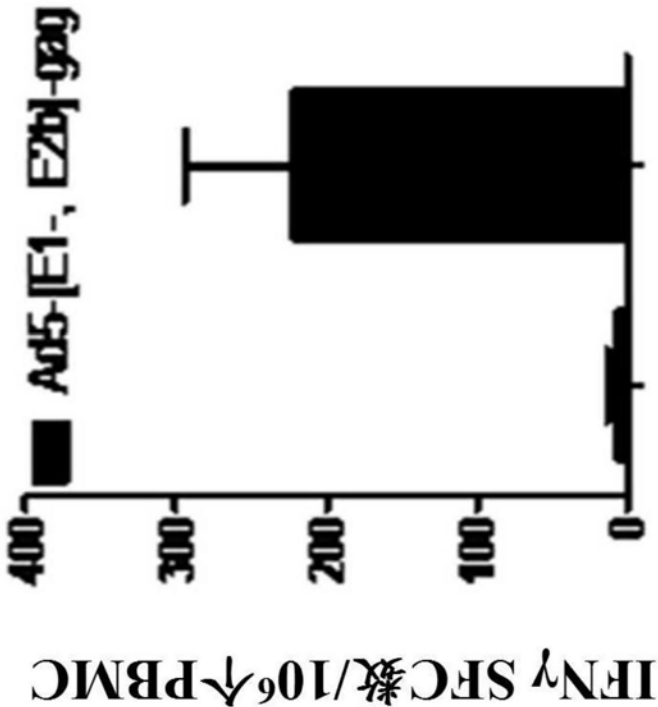


图10A

Ad5免疫的NHP的Ad5-[E1-,
E2b-]-gag免疫

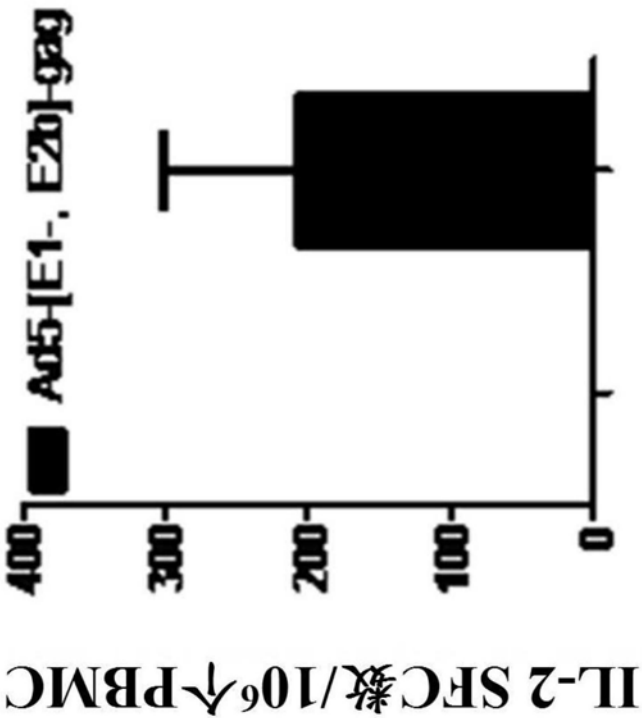


图10B

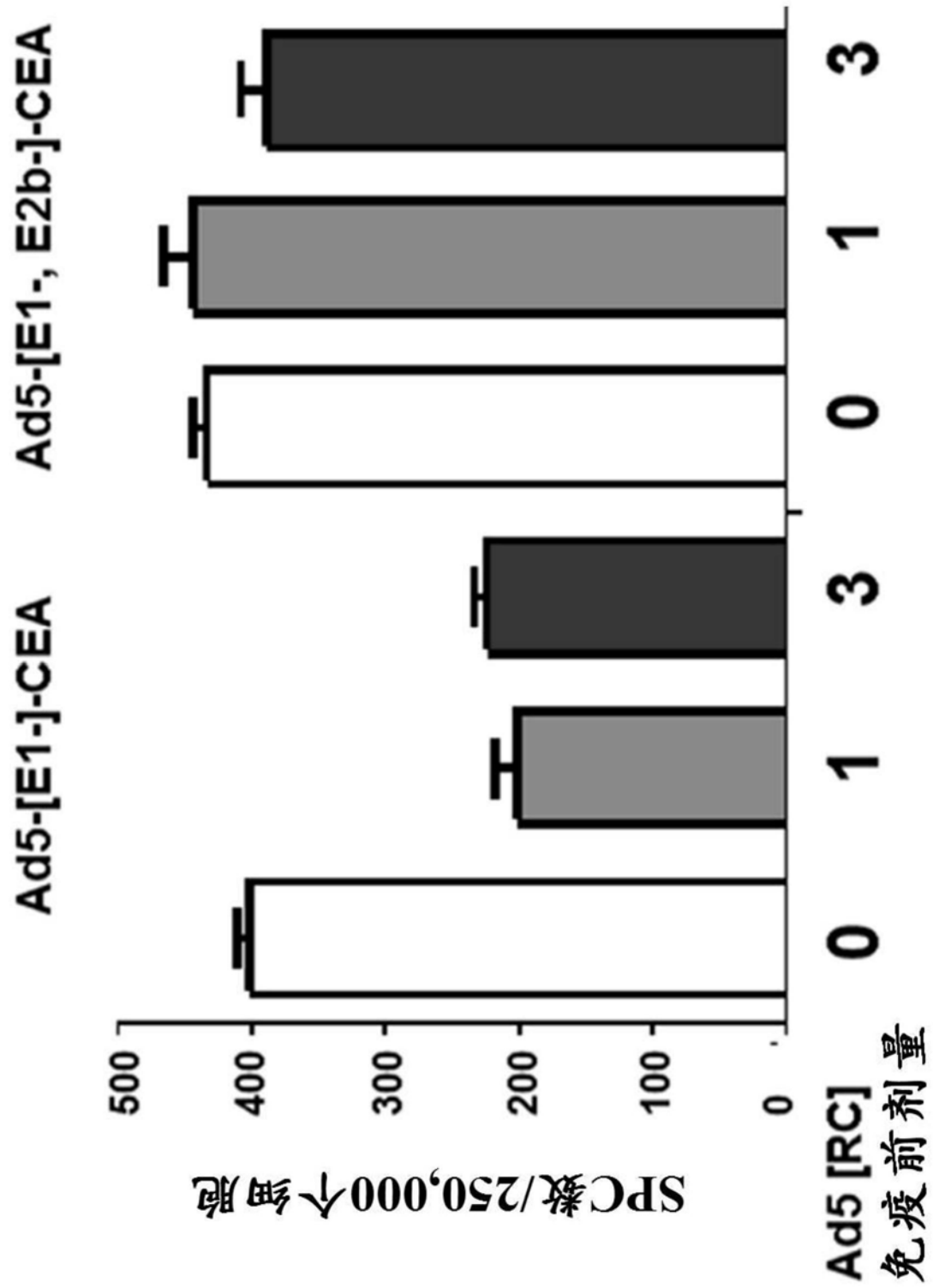


图11

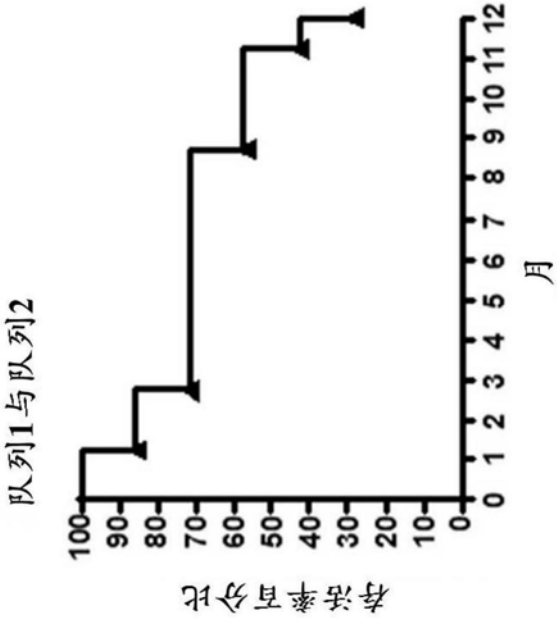


图12A

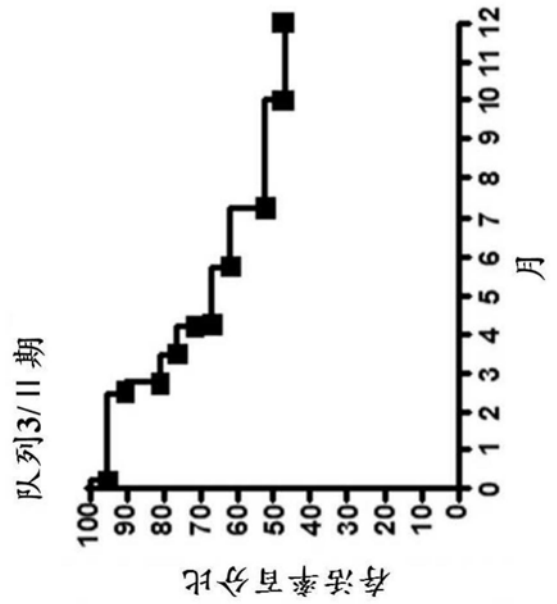


图12B

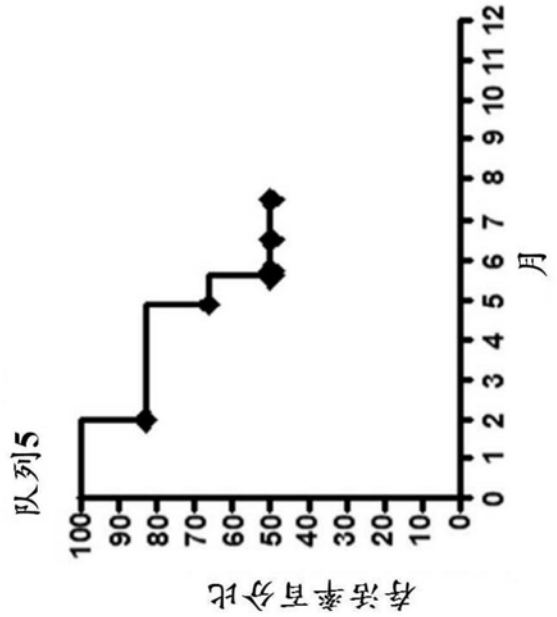


图12C

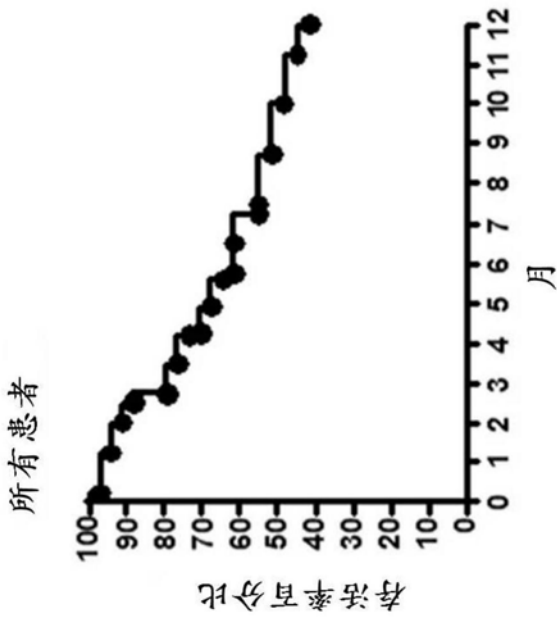


图12D

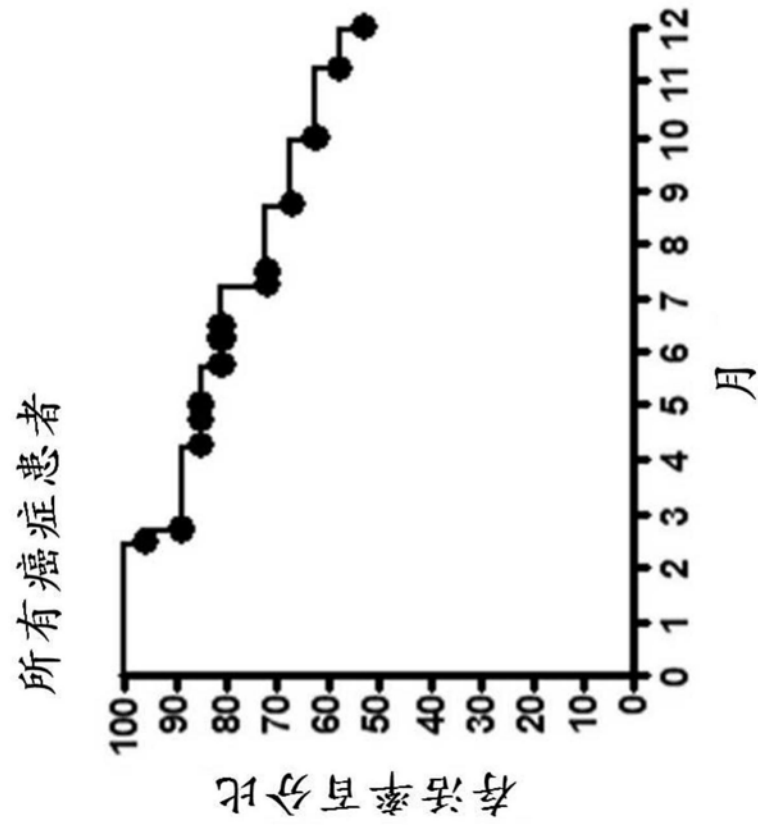


图13A

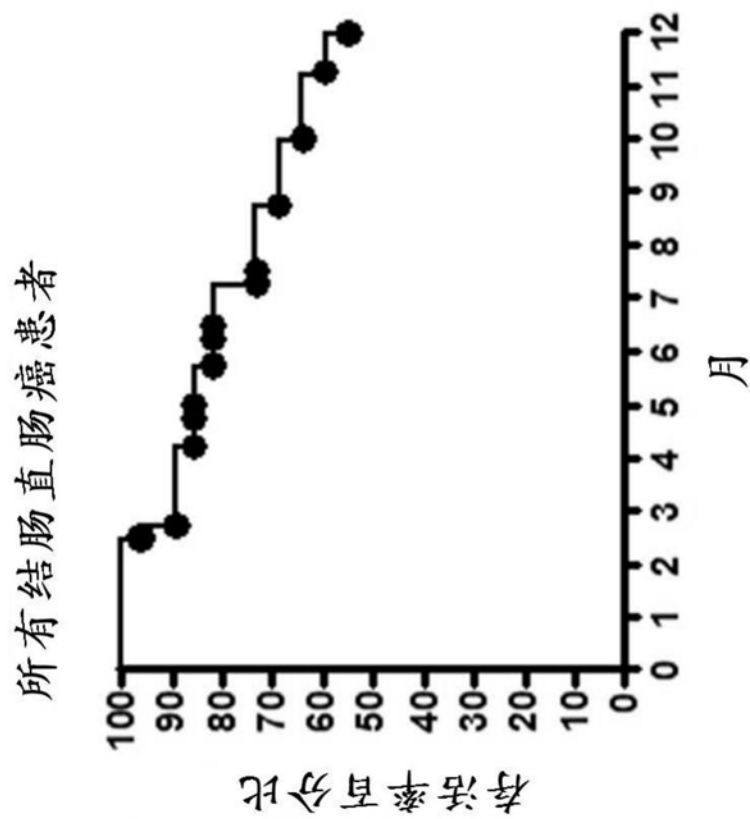


图13B

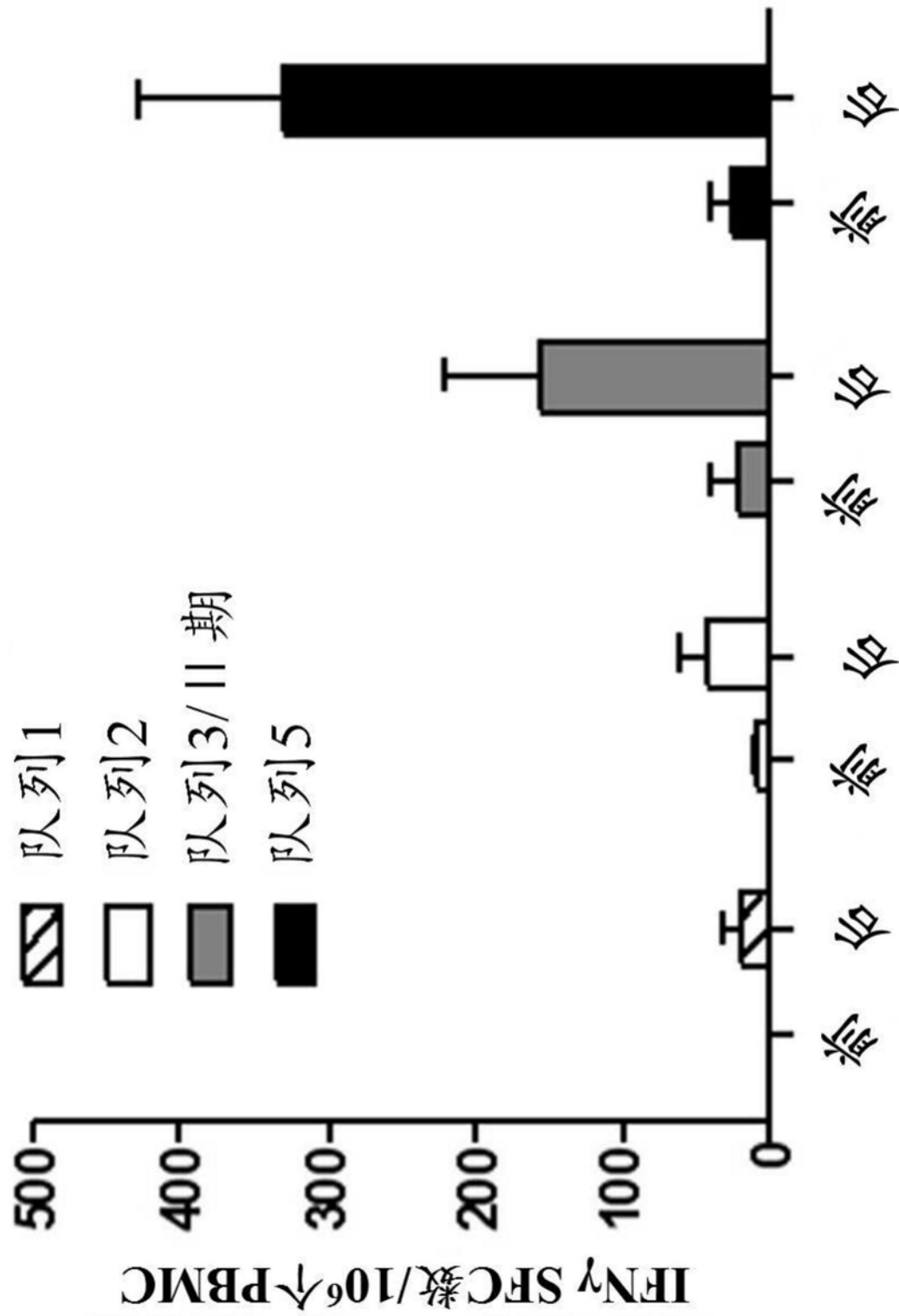


图14

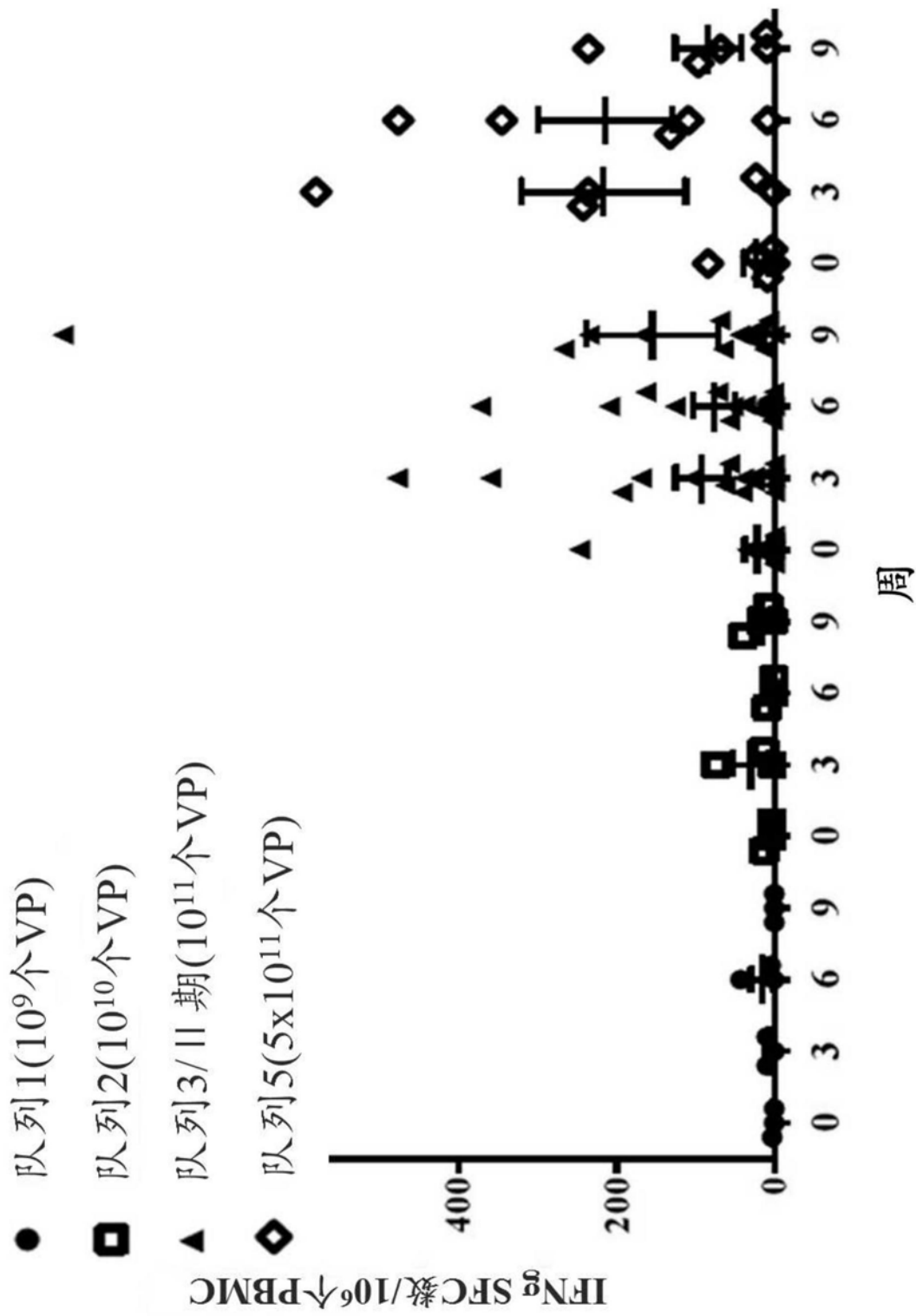


图15

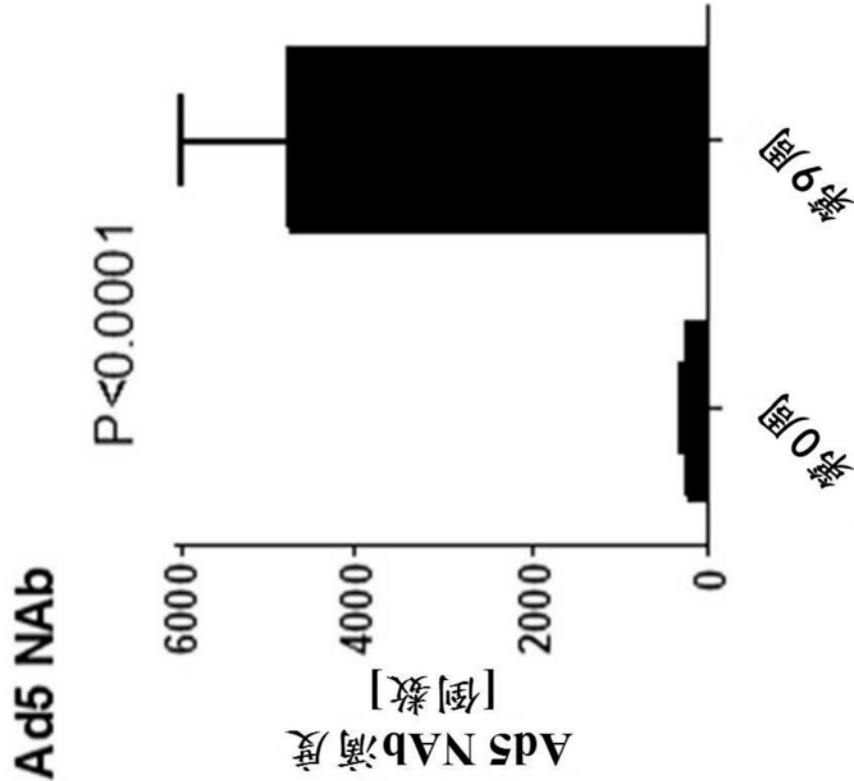


图16A

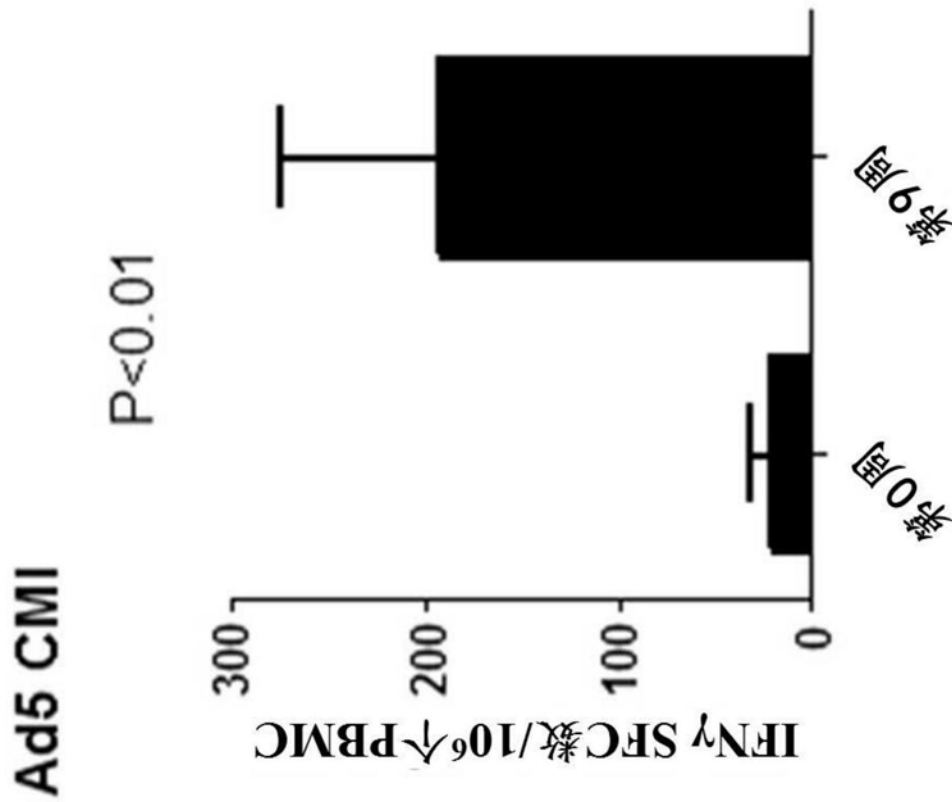


图16B

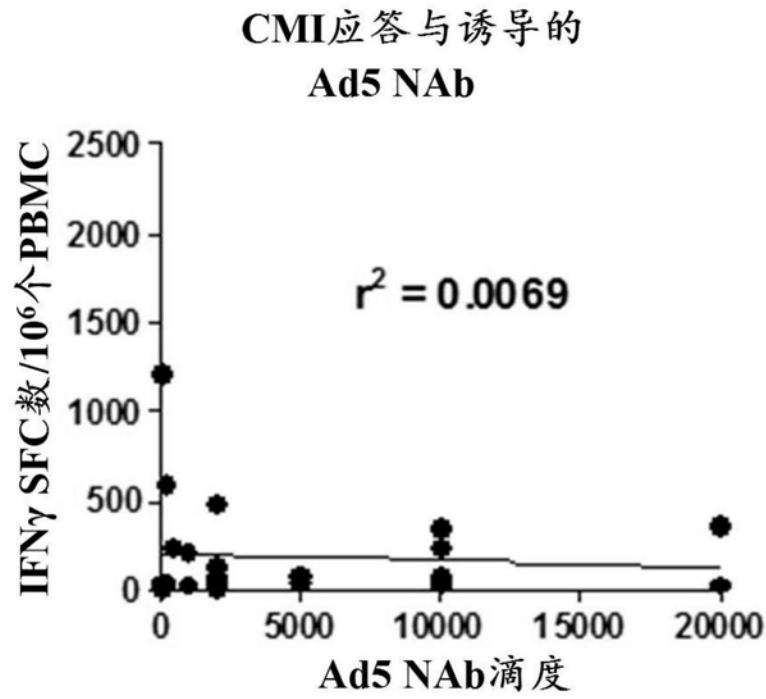


图17C

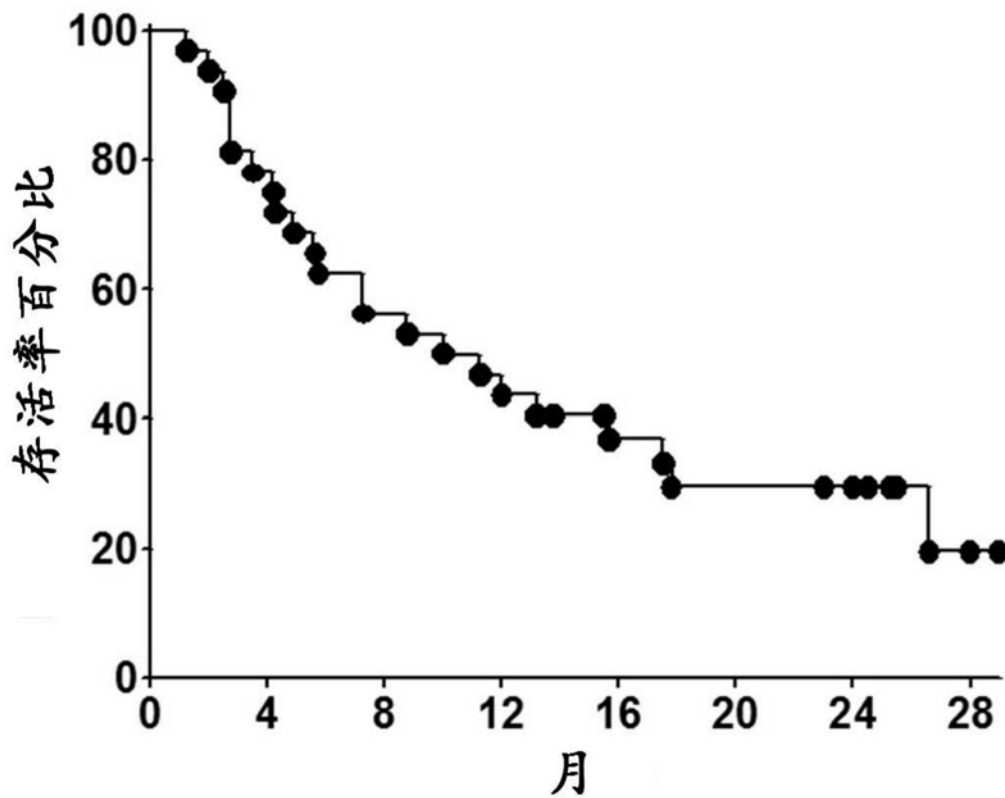


图18

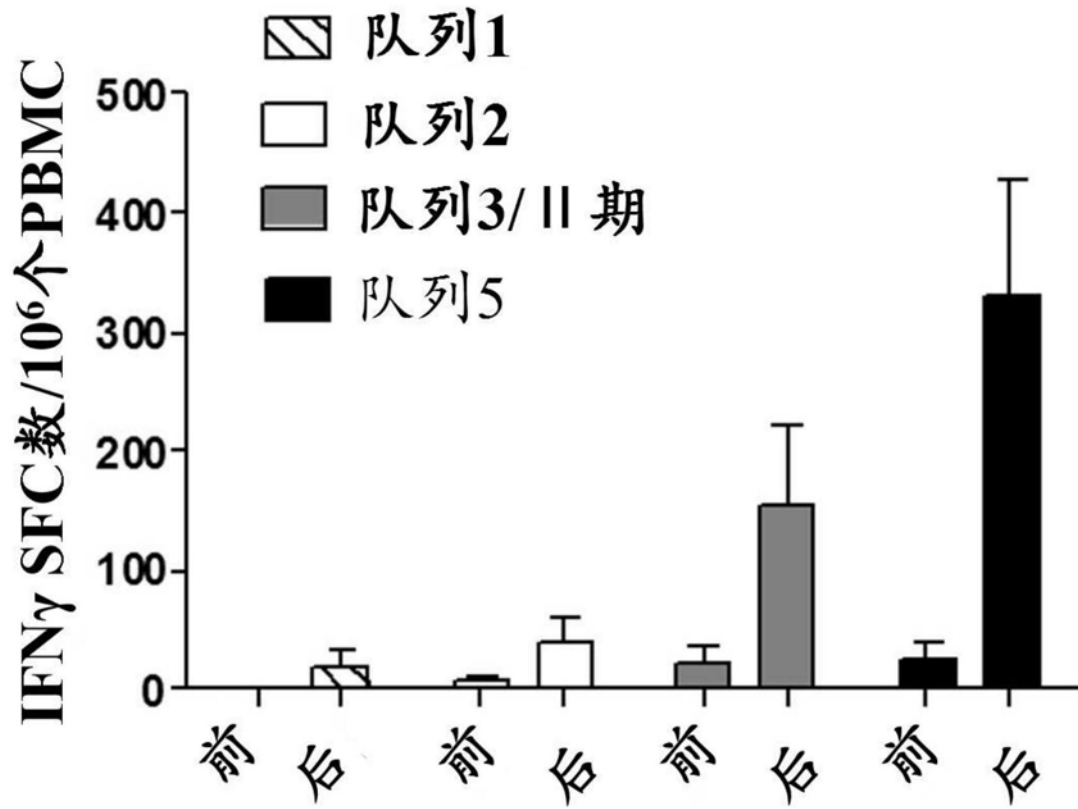


图19

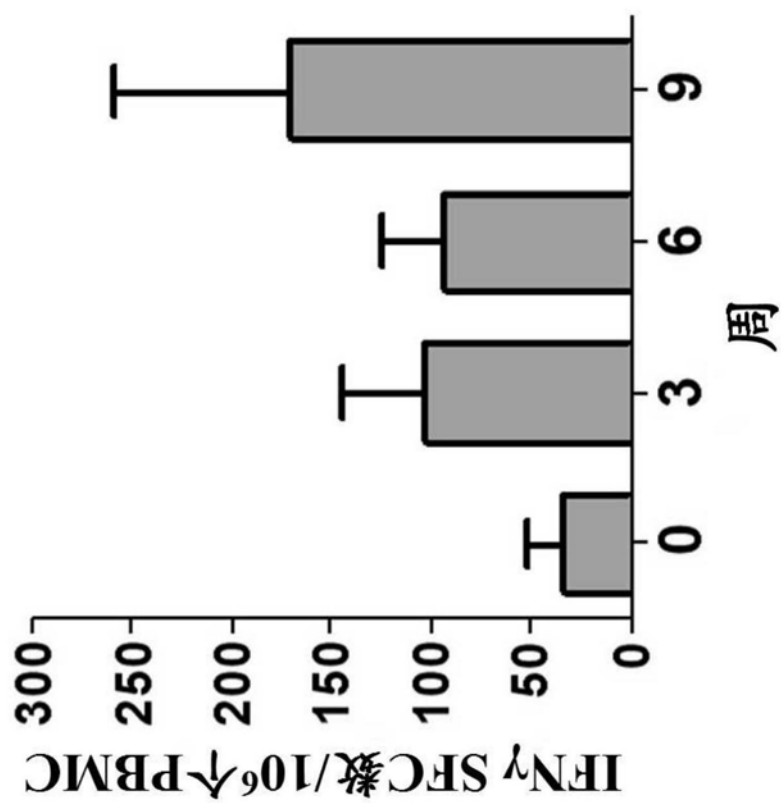


图20

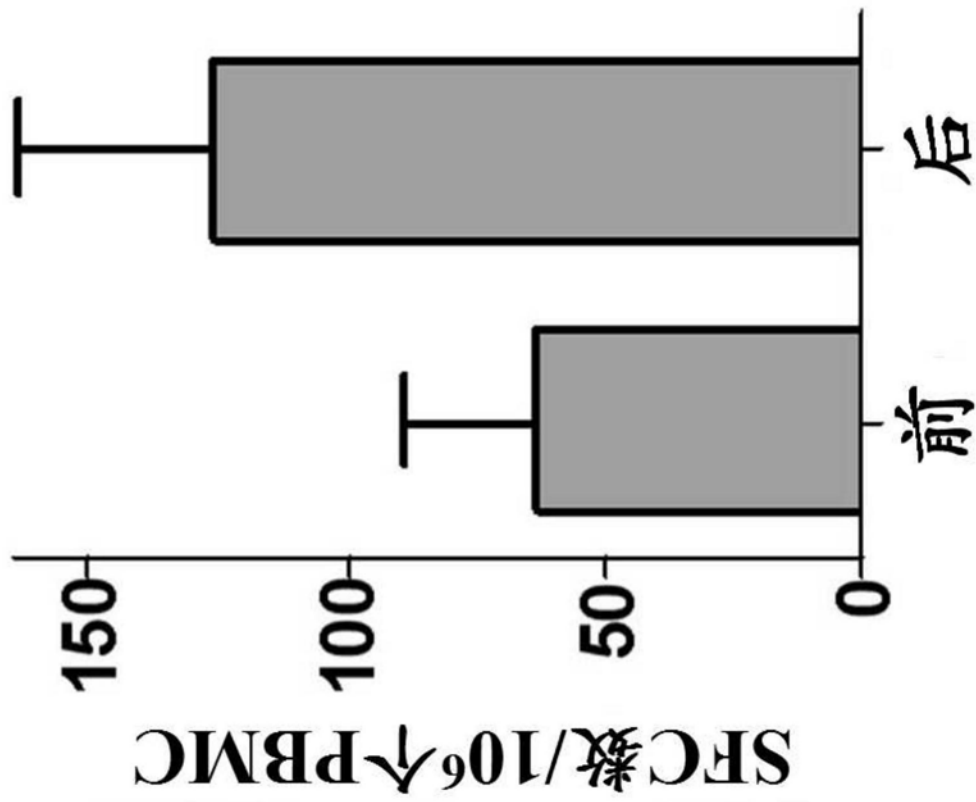


图21

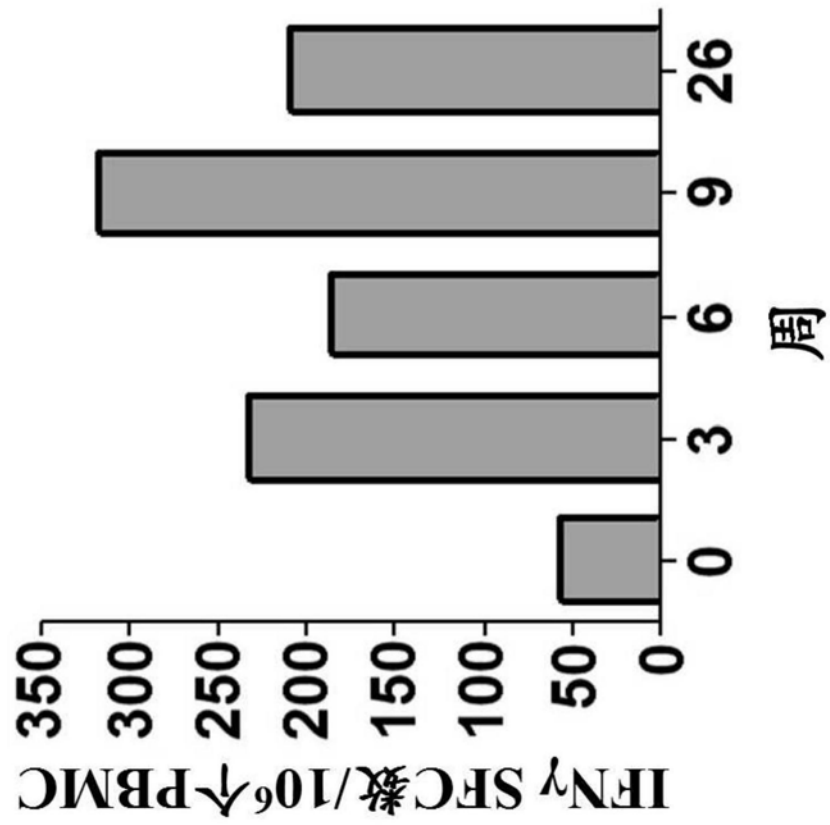


图22

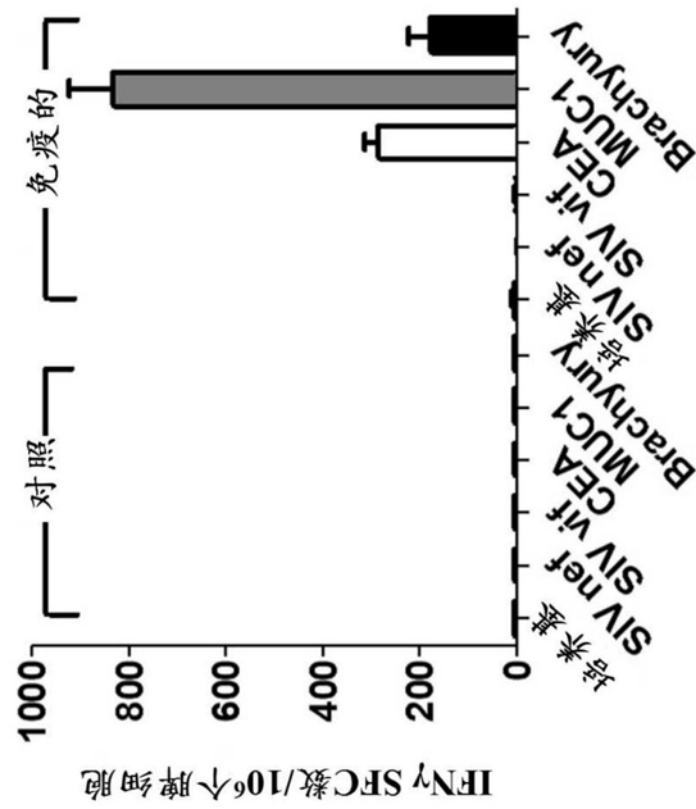


图23

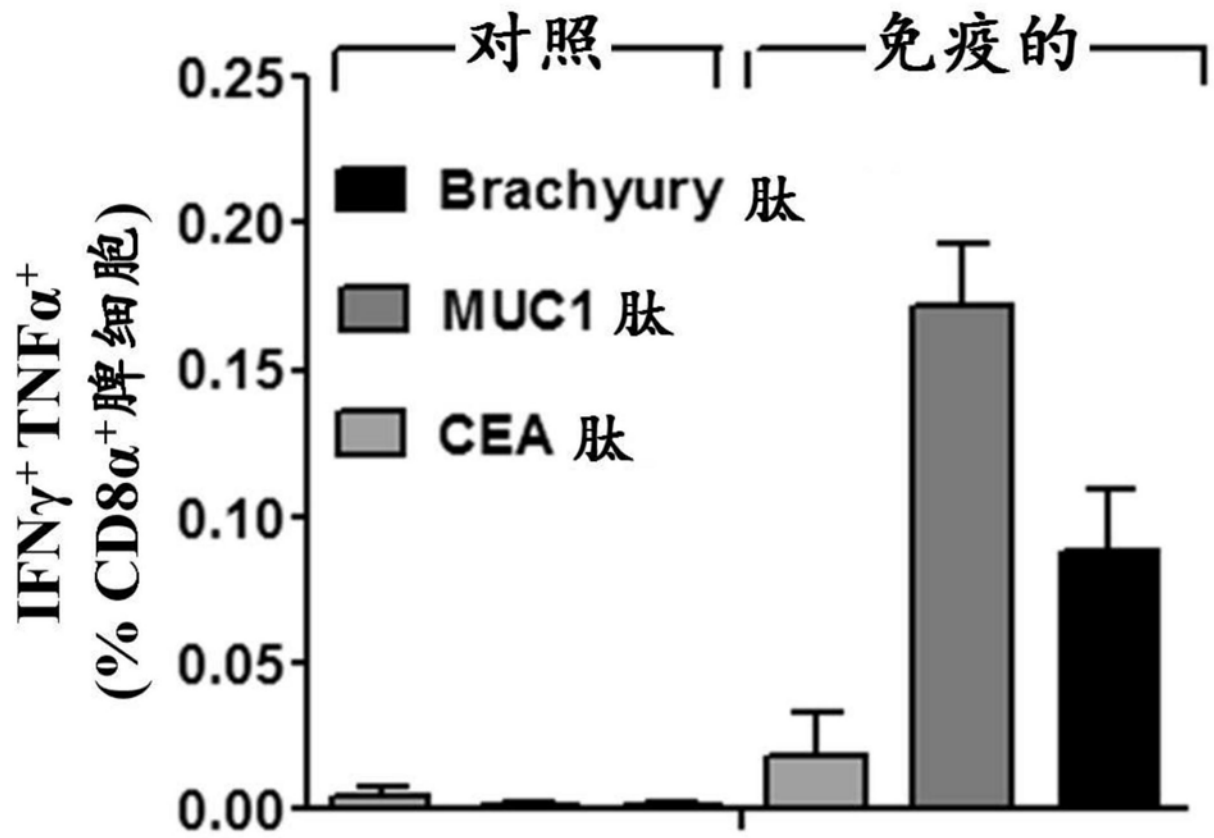


图24A

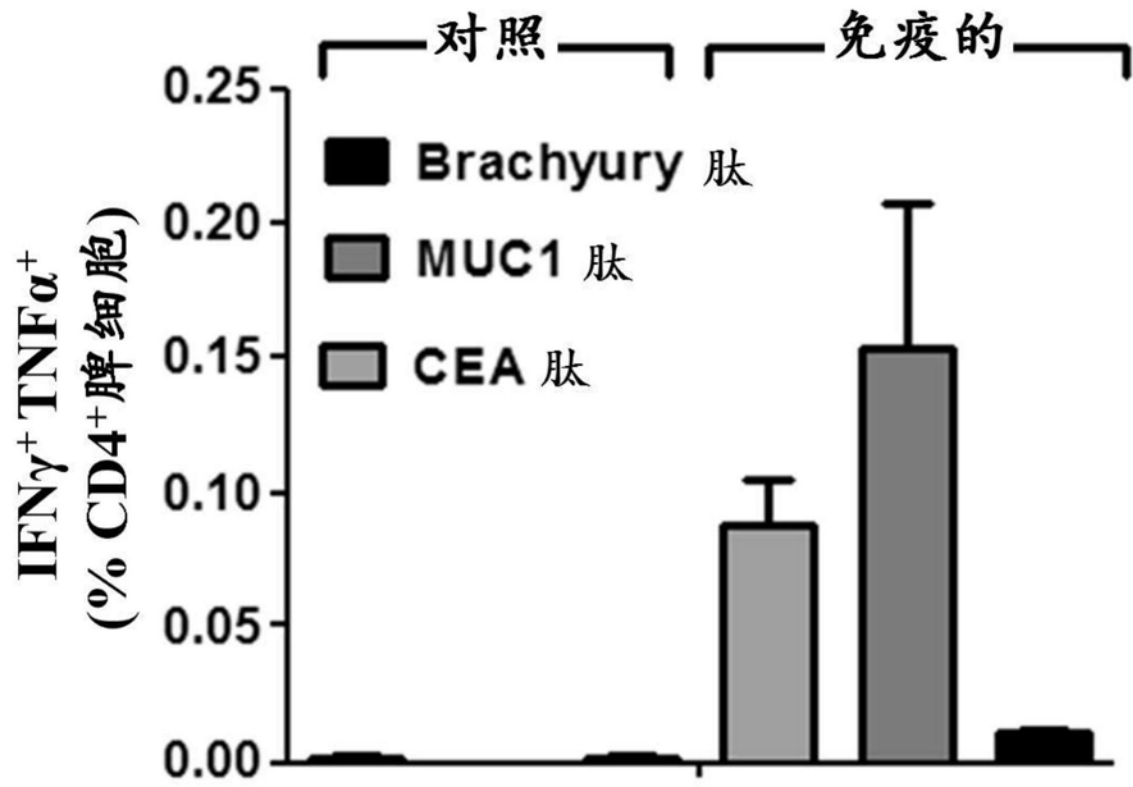


图24B

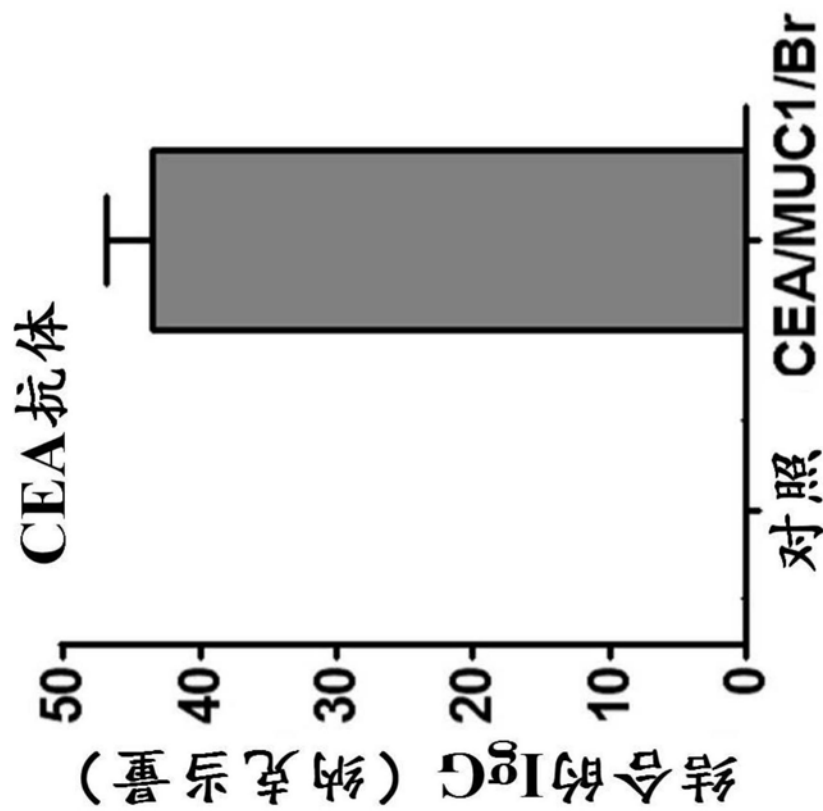


图25A

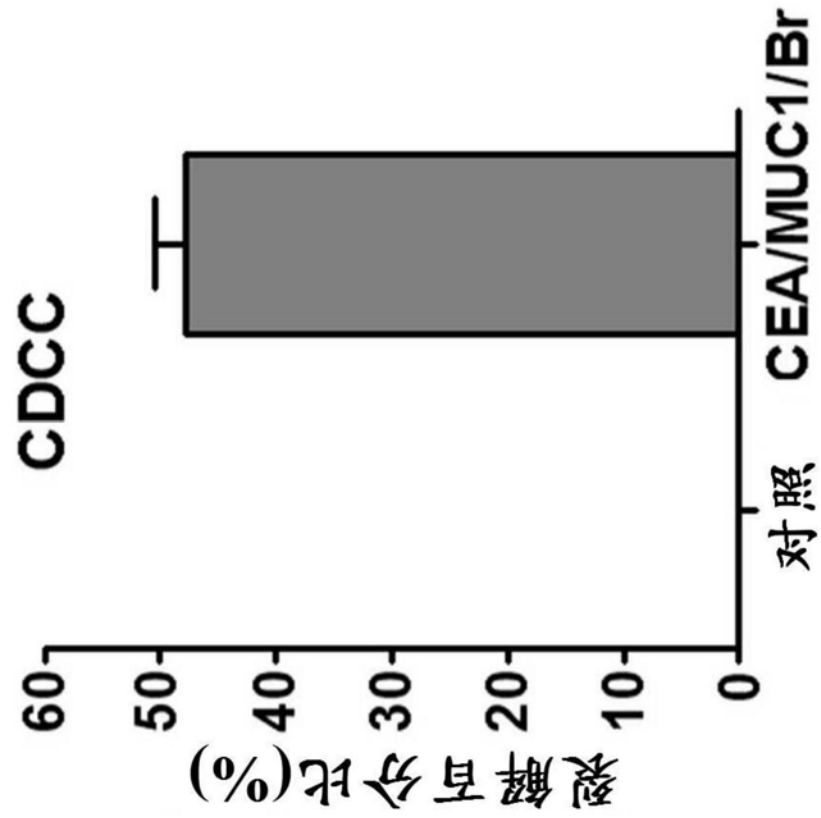


图25B

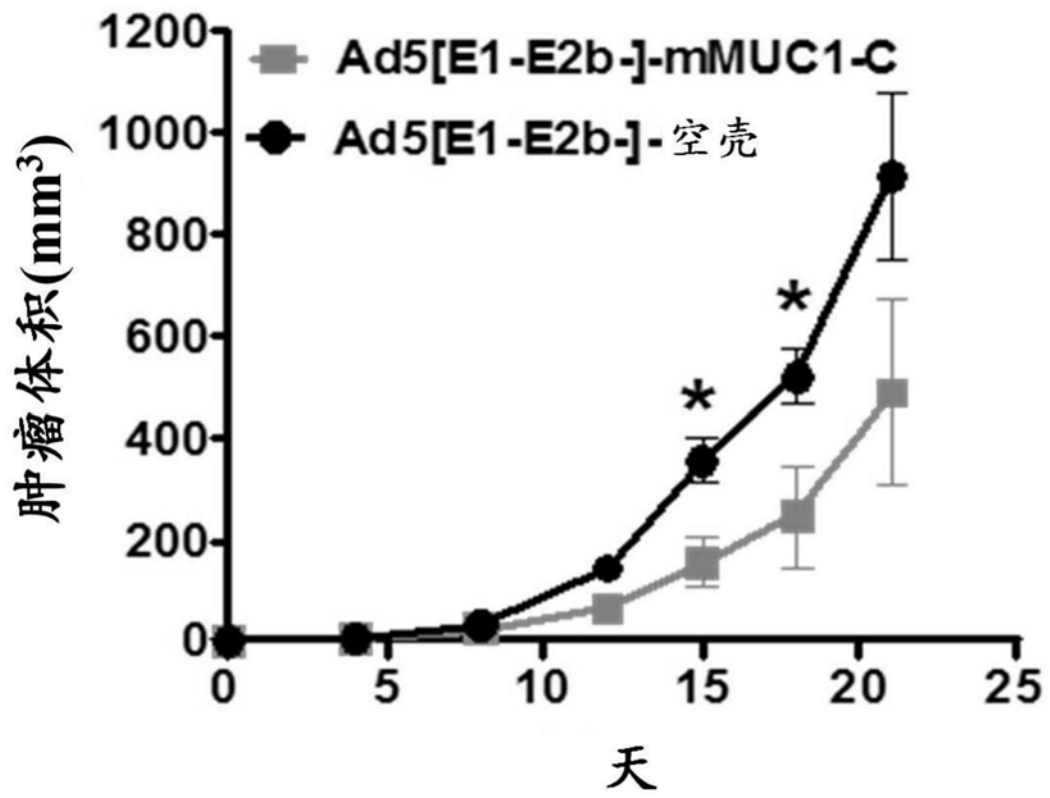


图26A

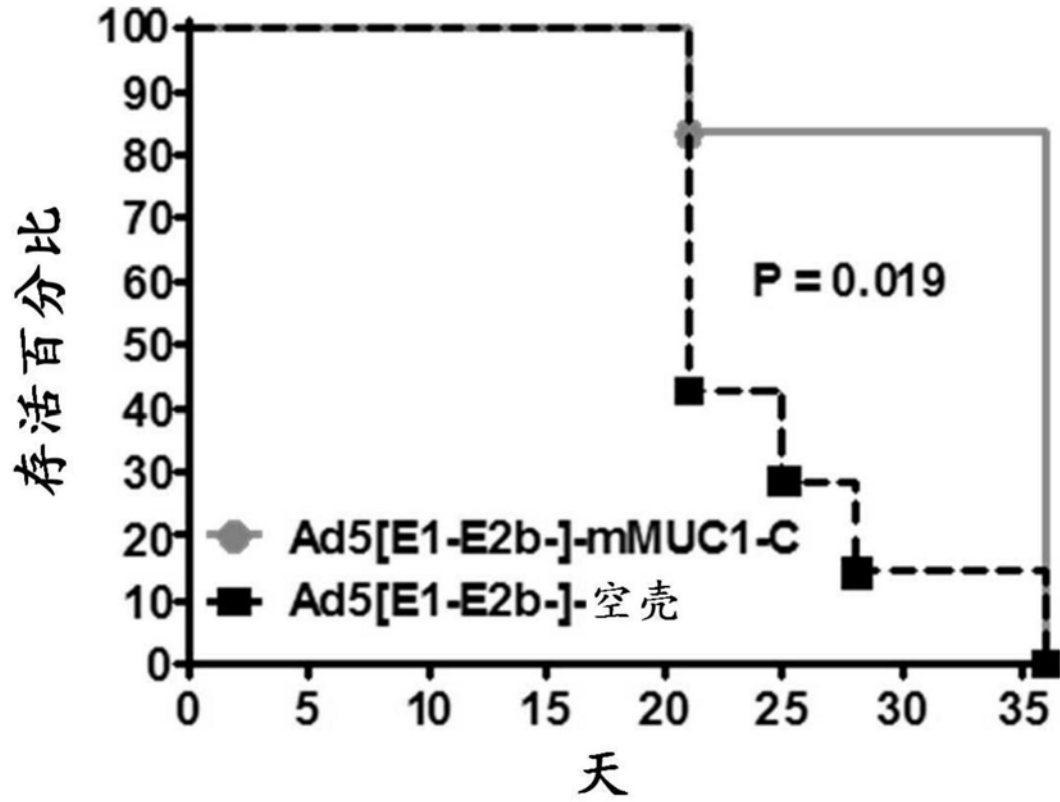


图26B

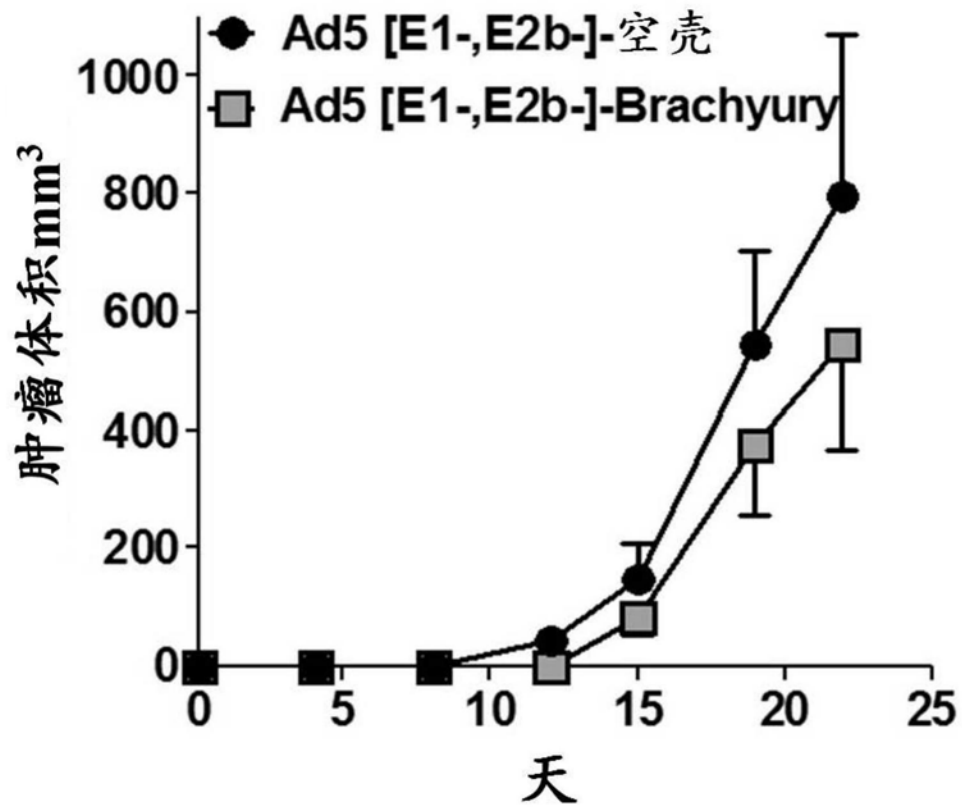


图27

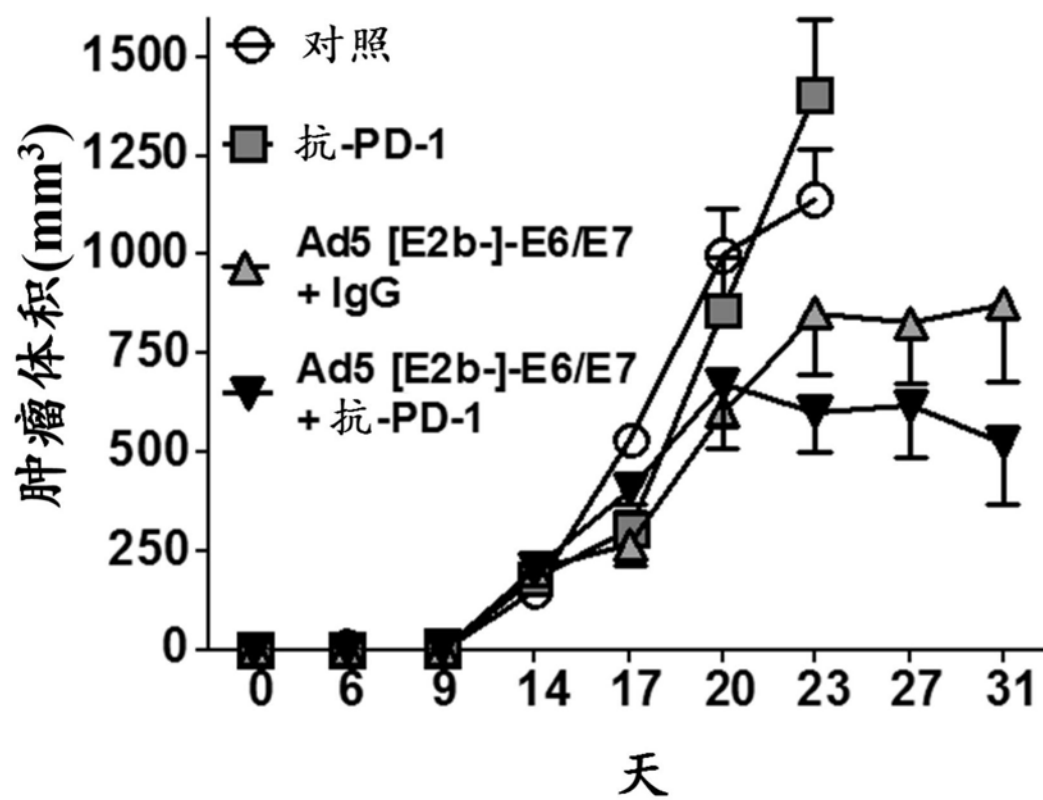


图28

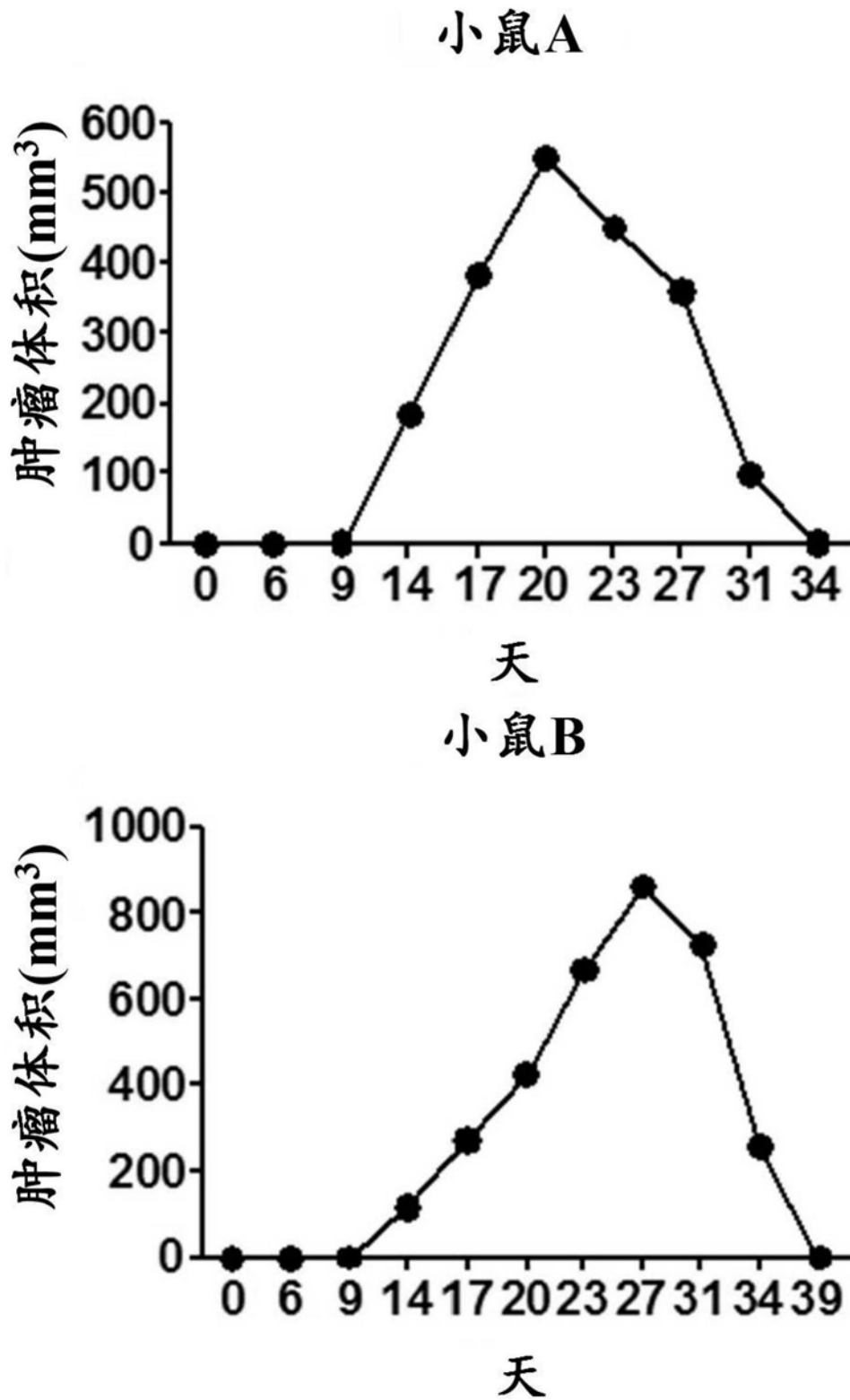


图29



图30A



图30B

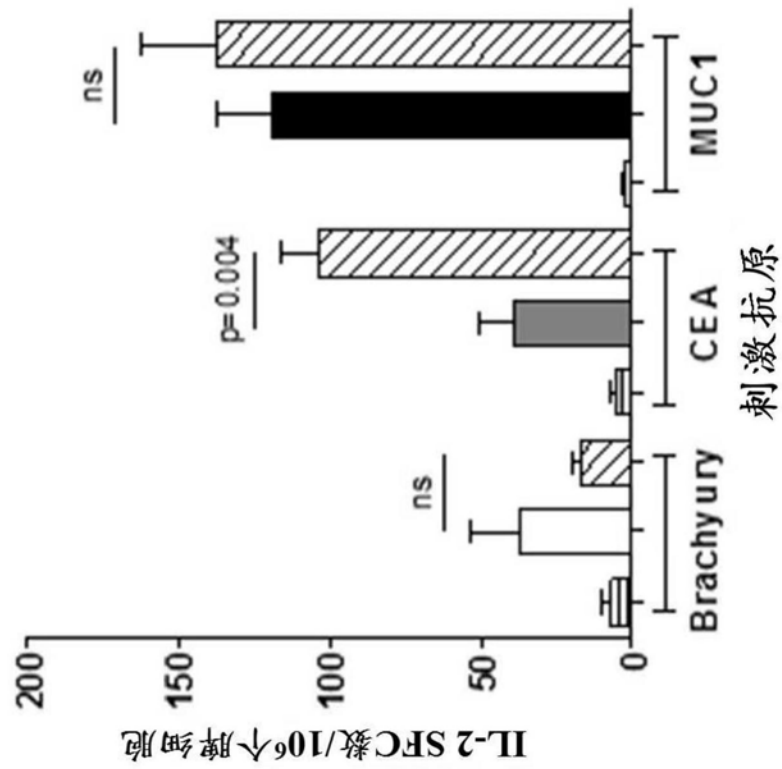


图 31B

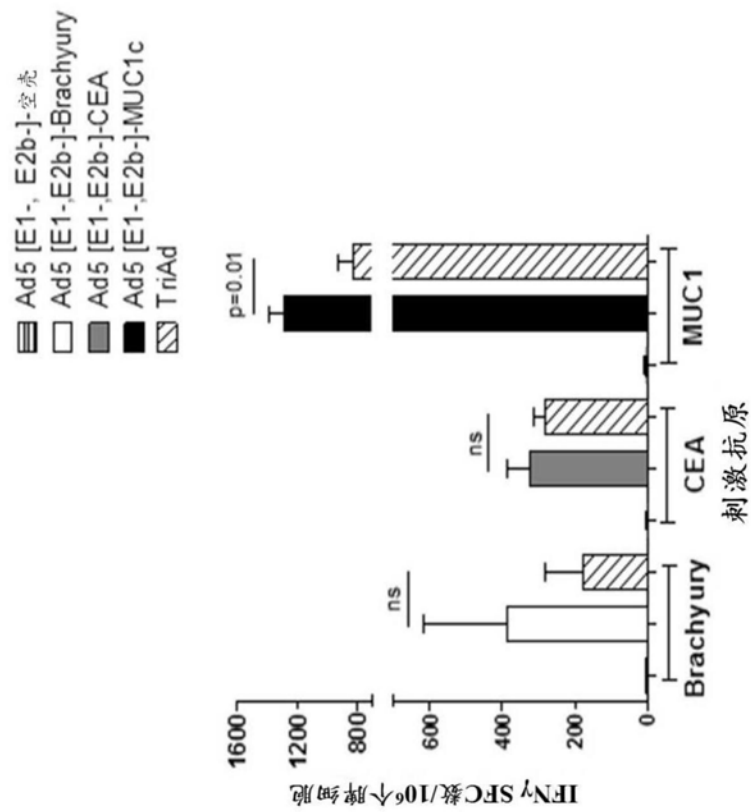


图 31A

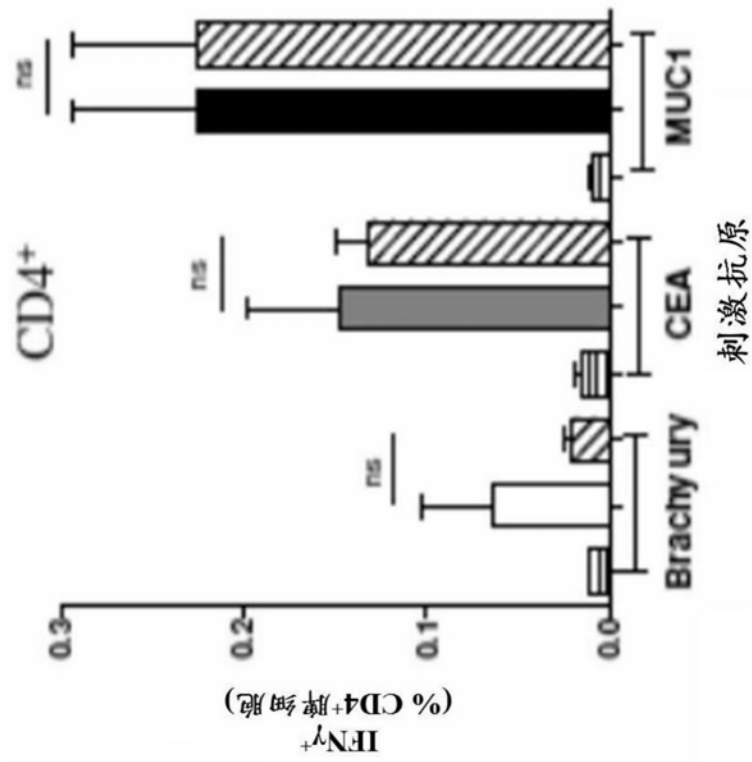


图 32B

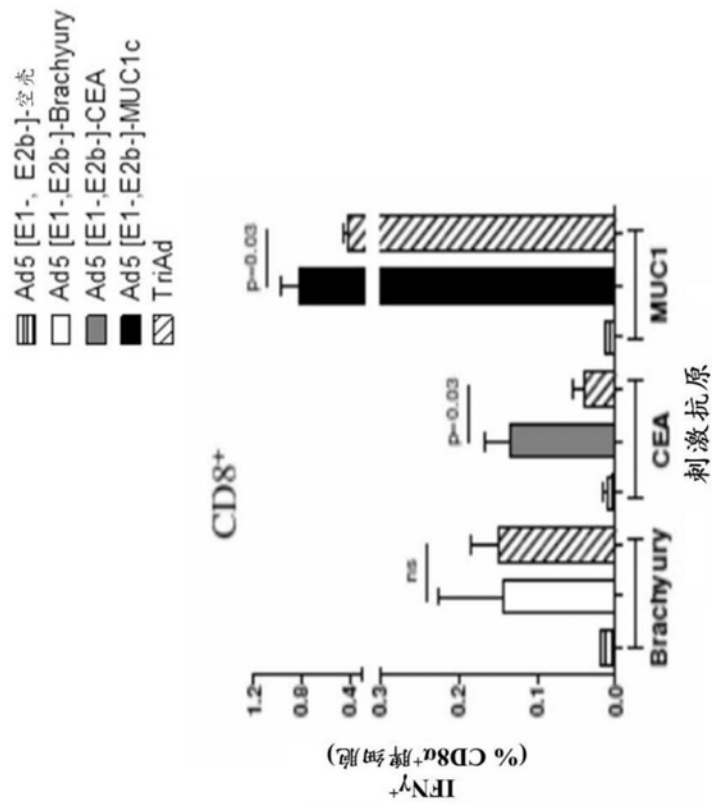


图 32A

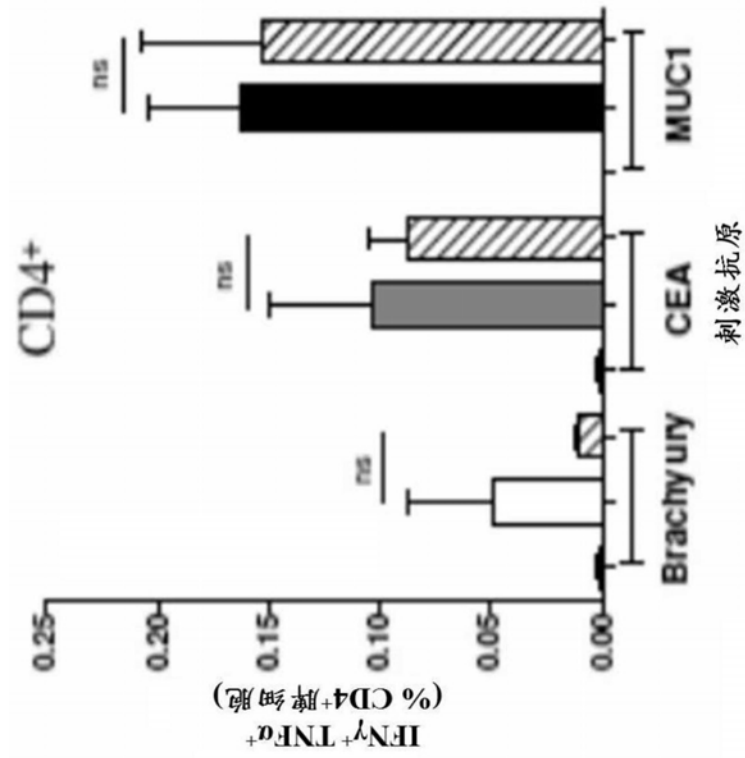


图 32D

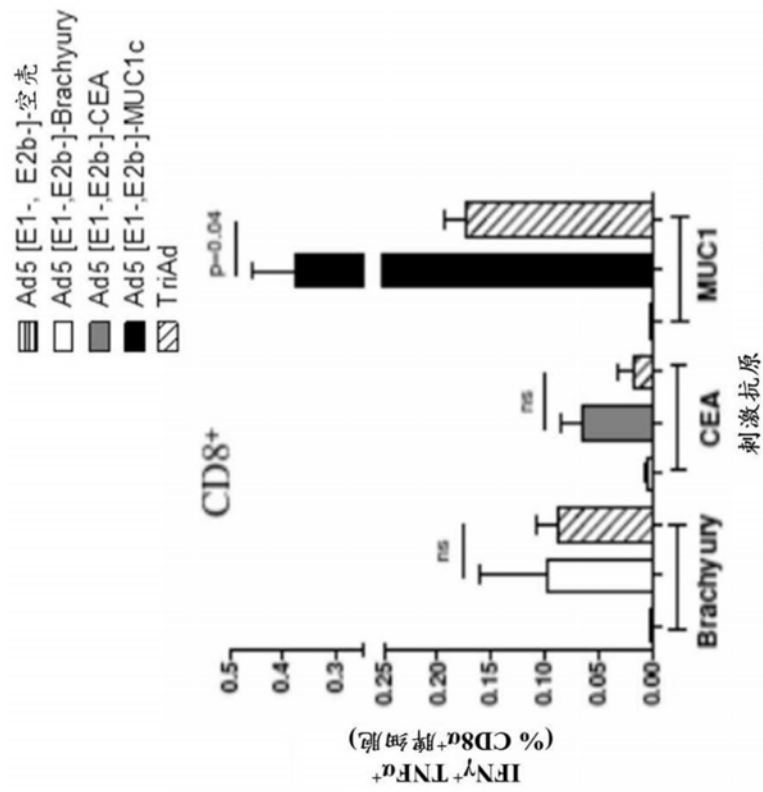


图 32C

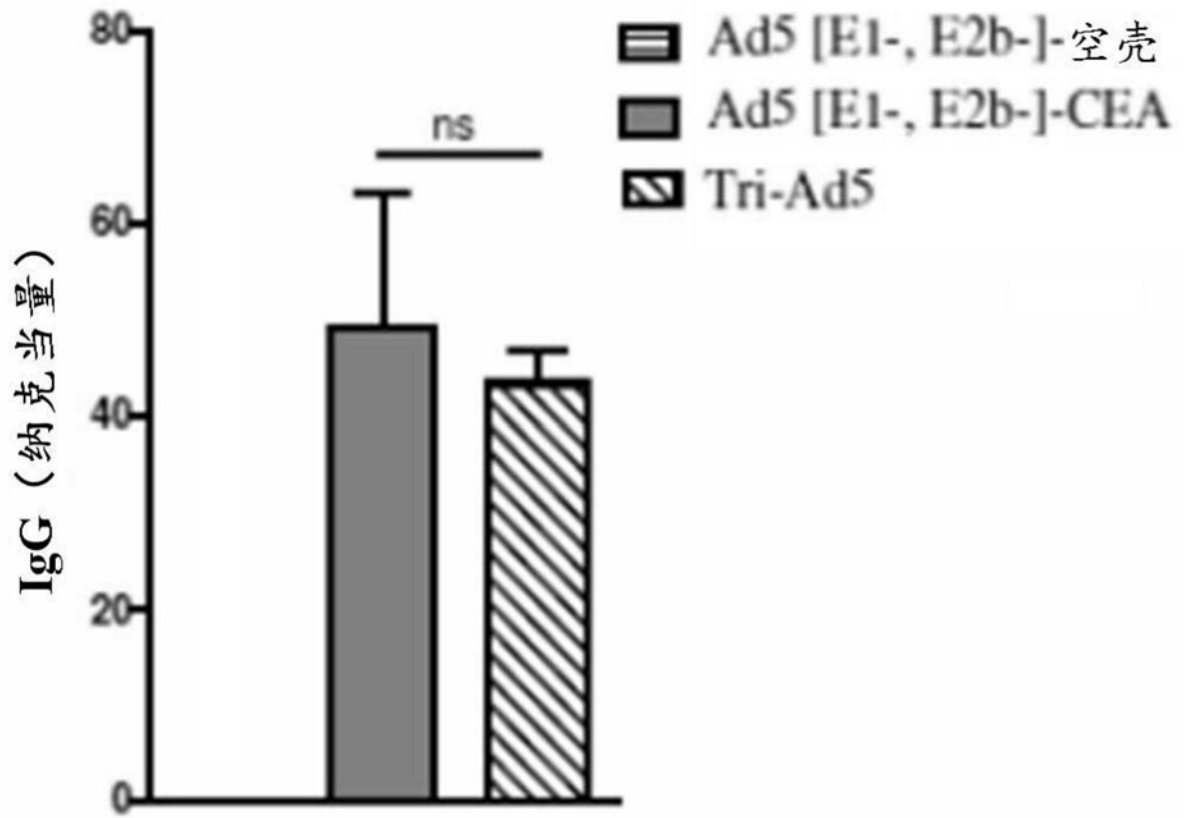


图33A

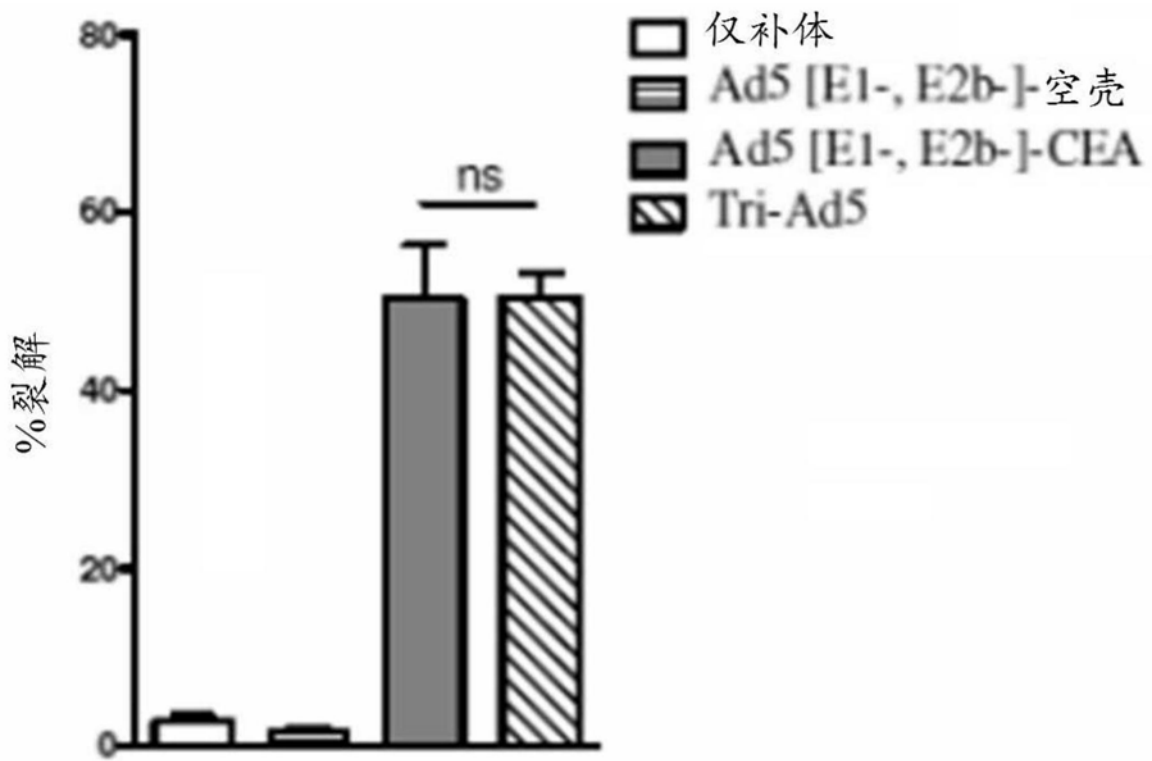


图33B

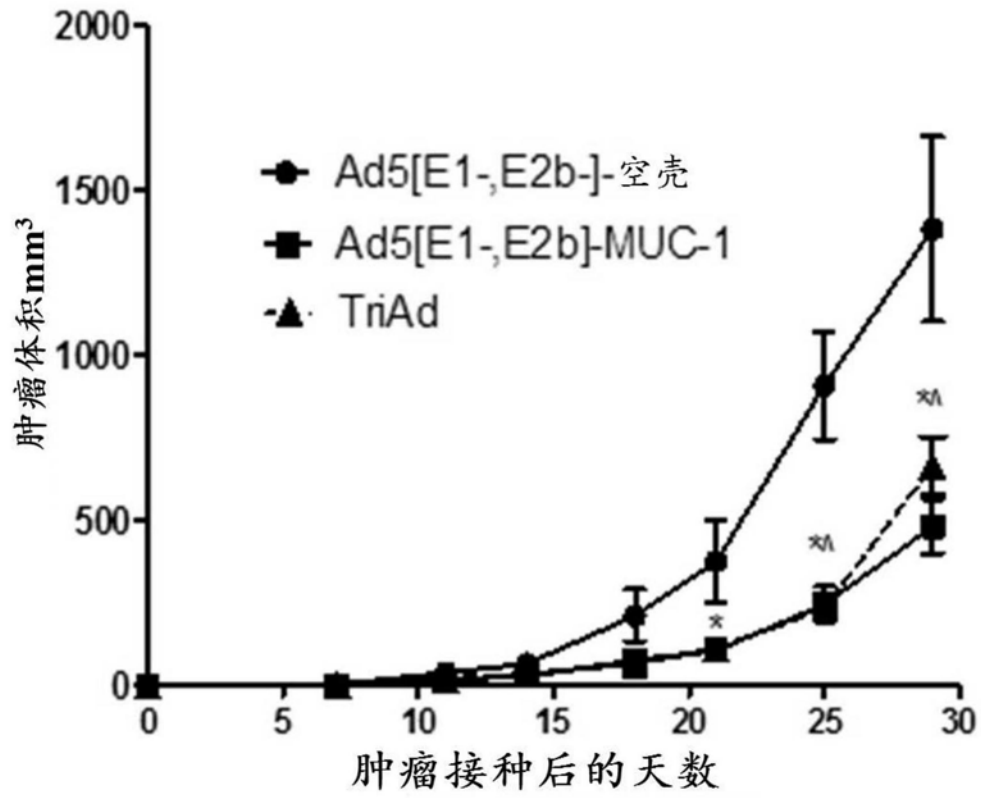


图34

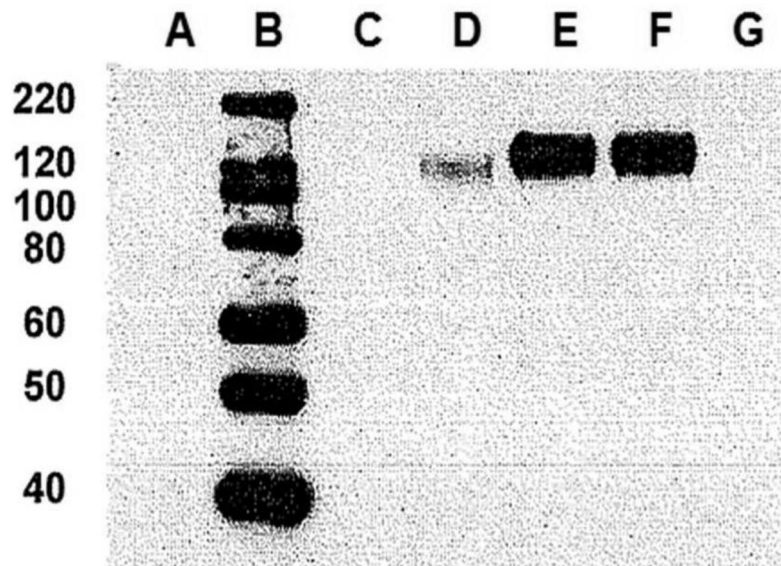


图35

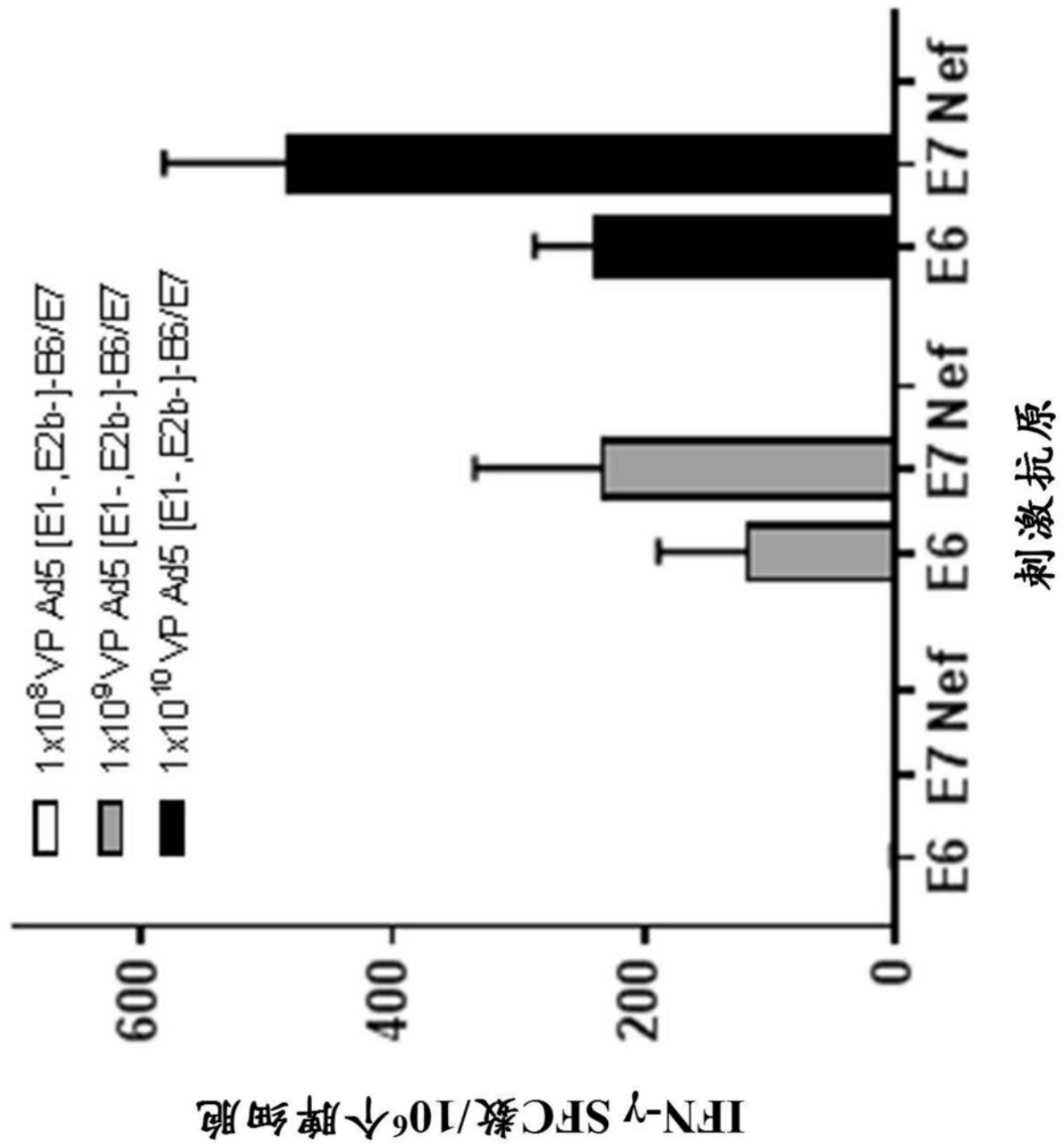


图36

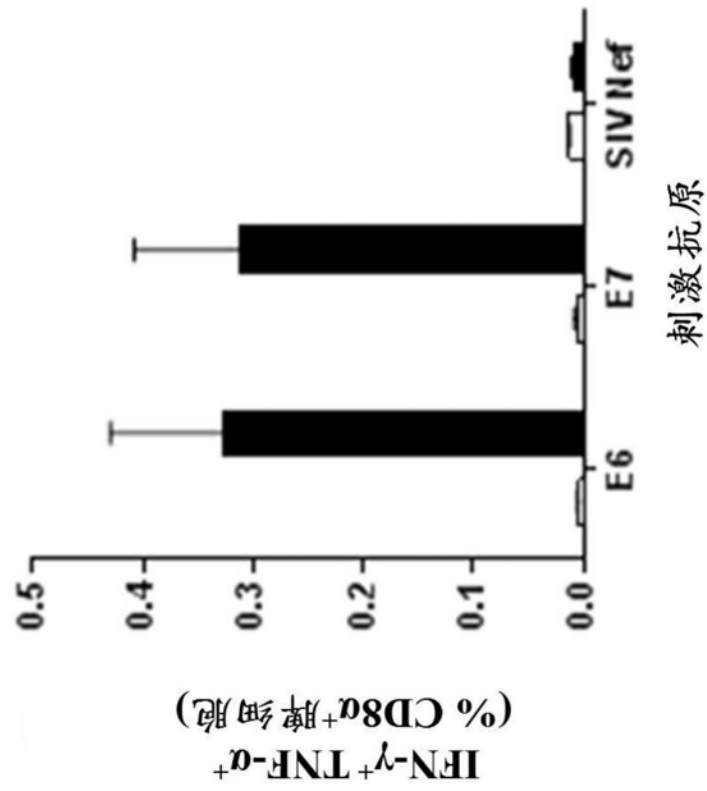


图 37B

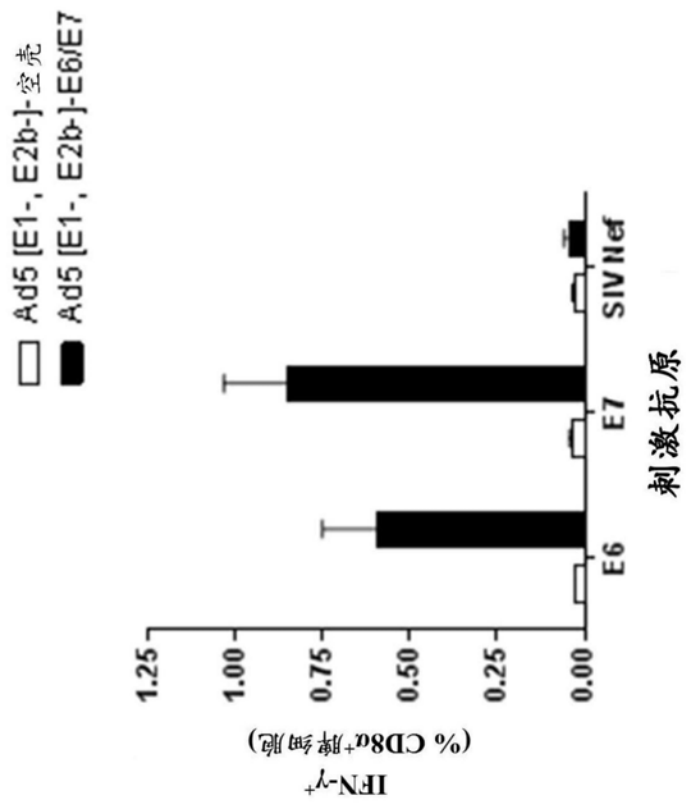


图 37A

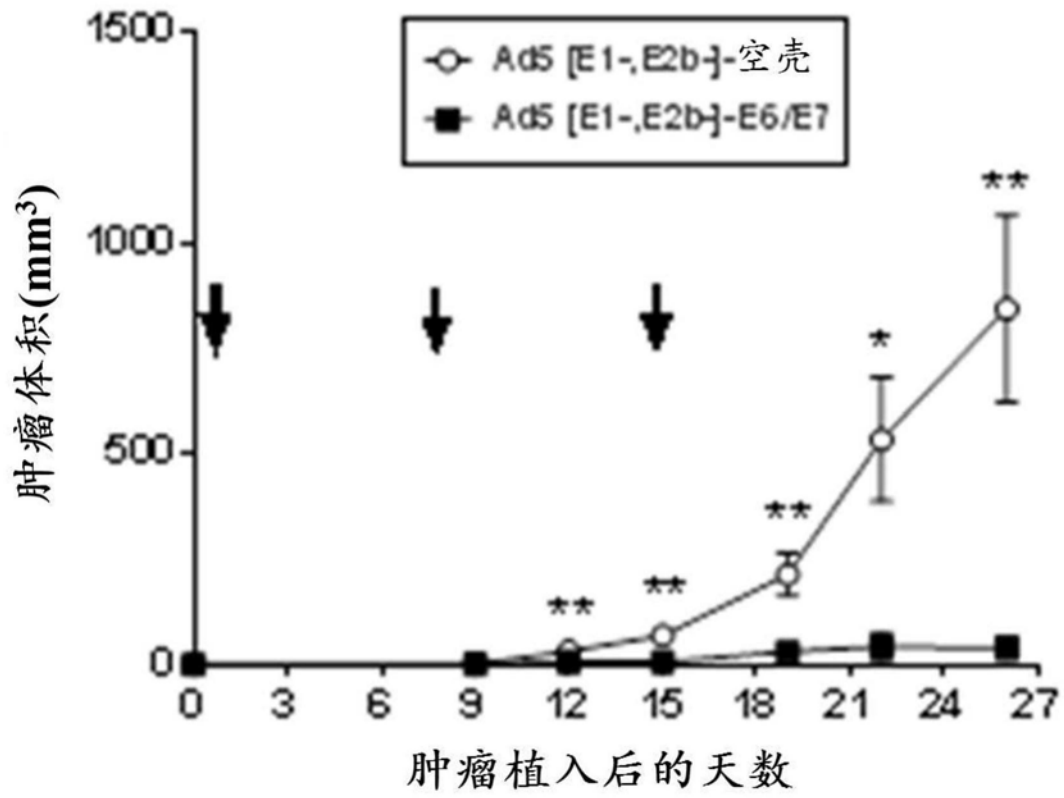


图38A

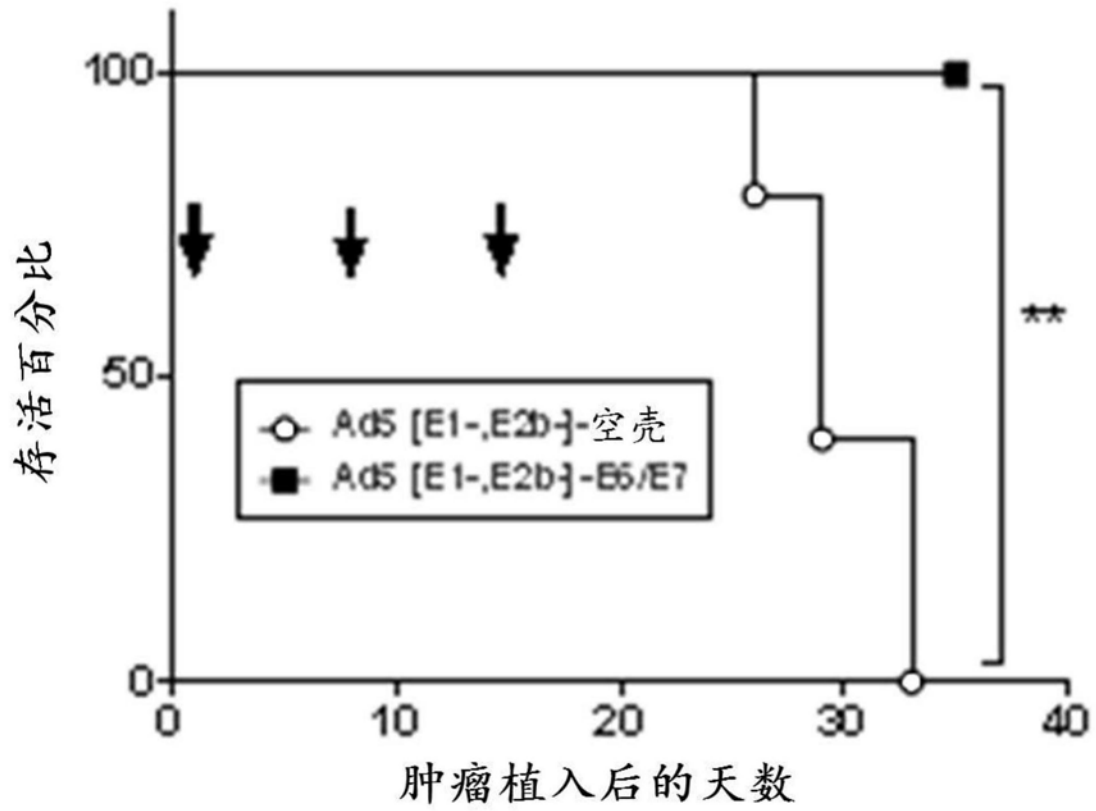


图38B

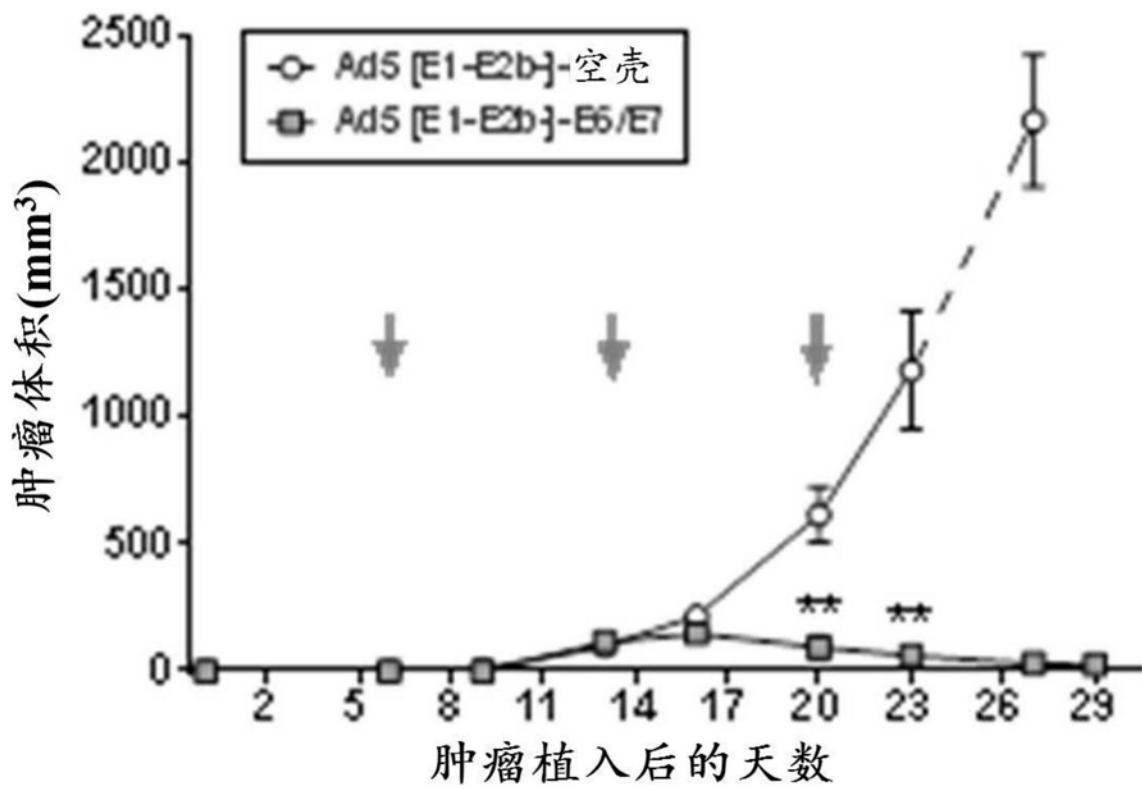


图39A

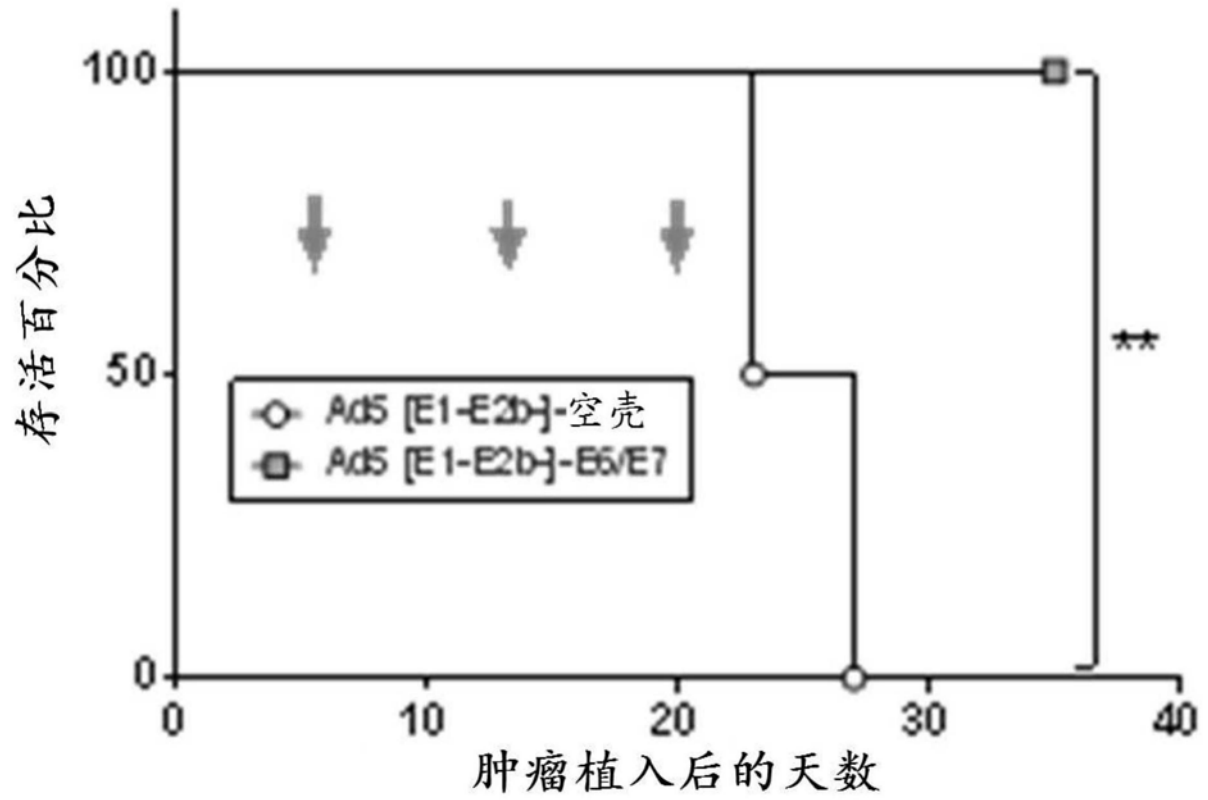


图39B

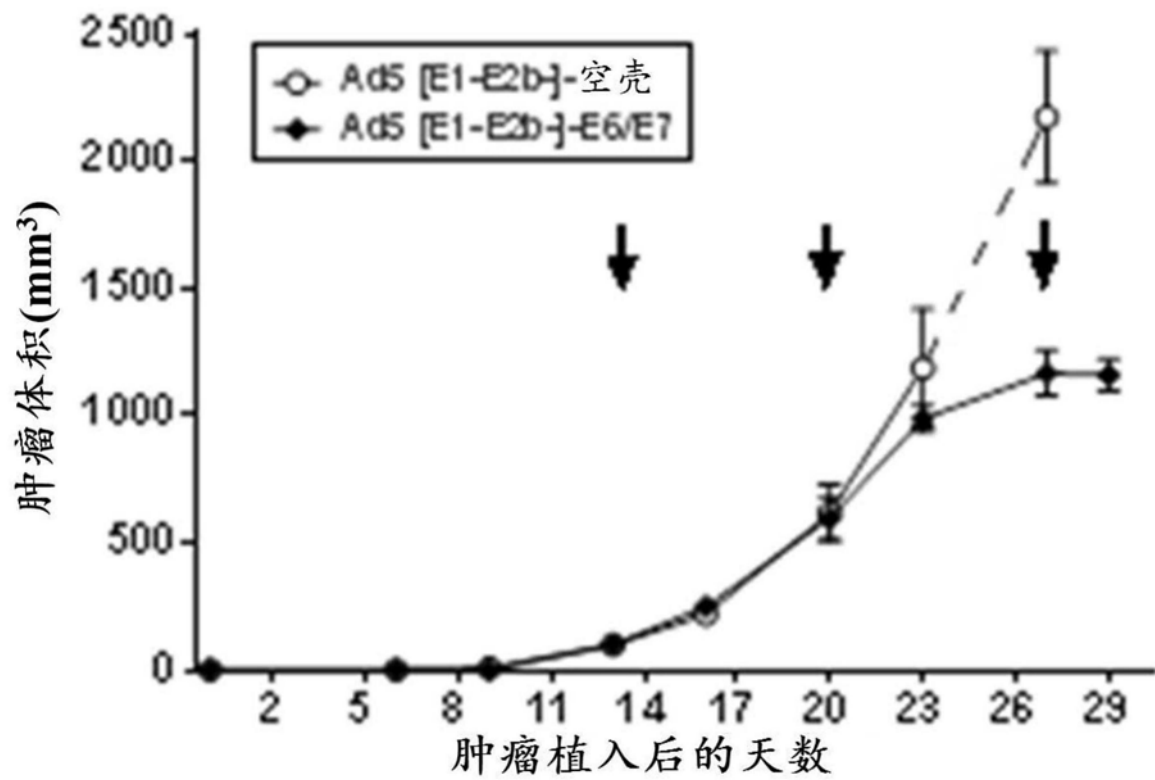


图40A

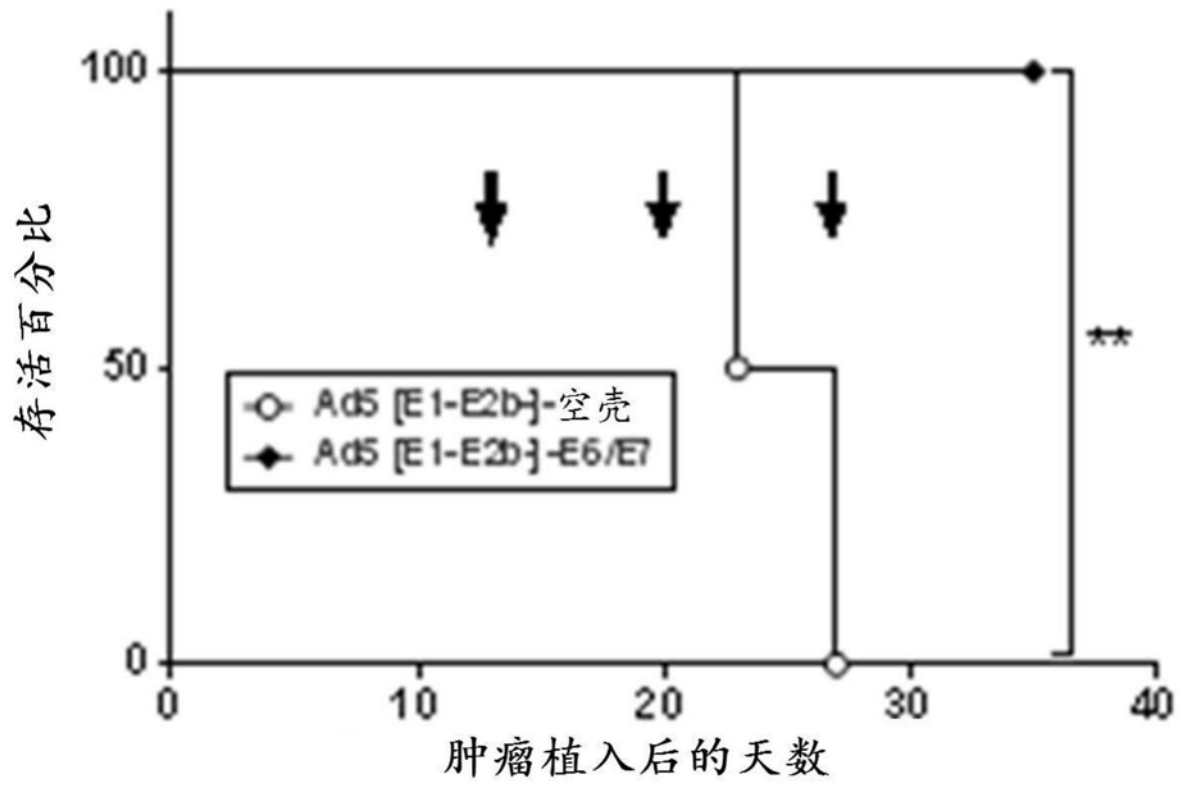


图40B

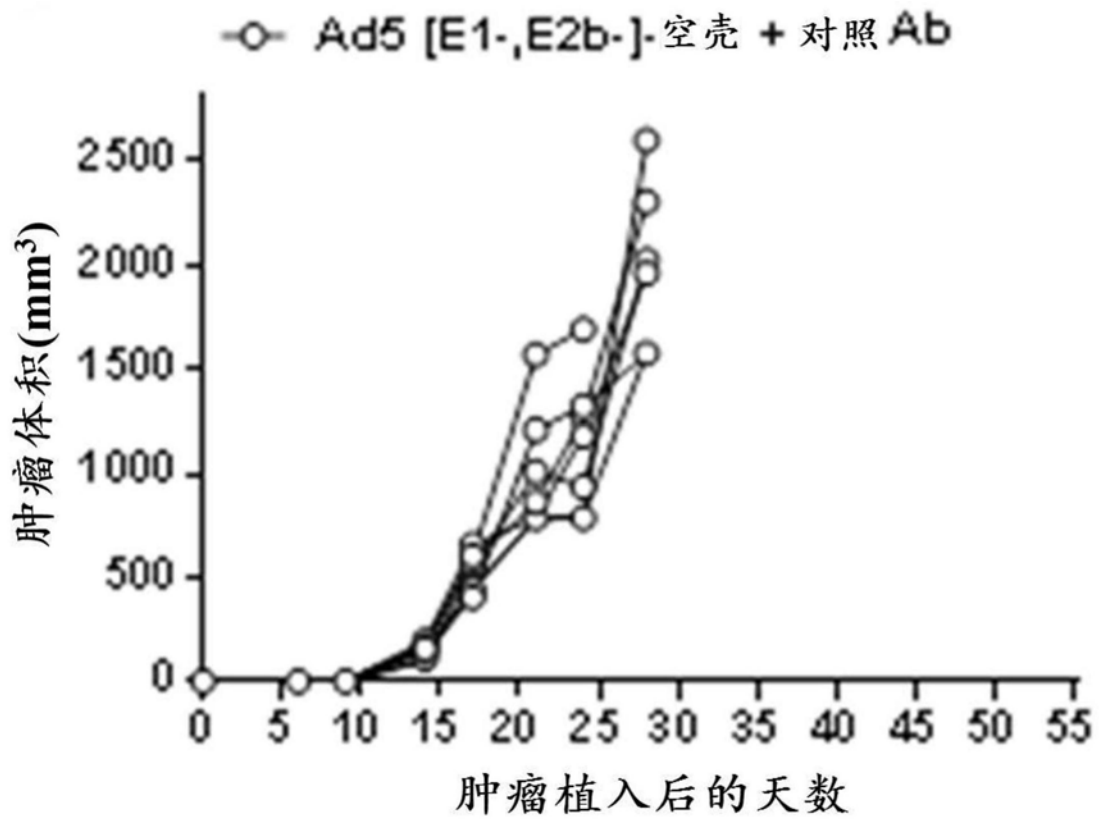


图41A

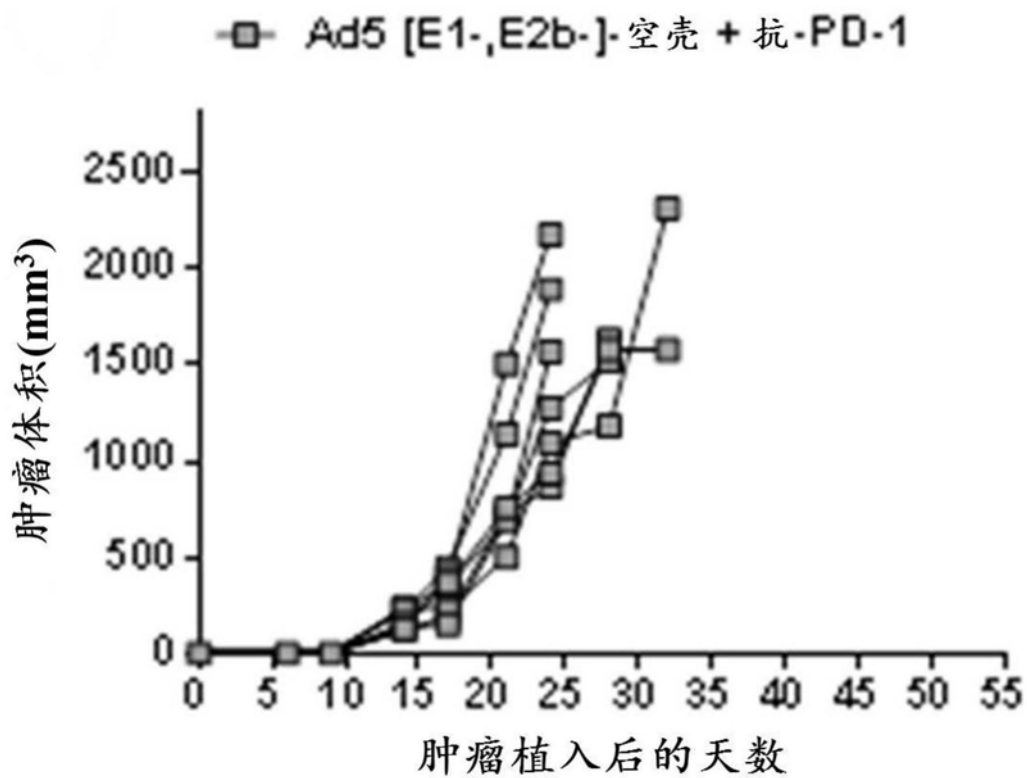


图41B

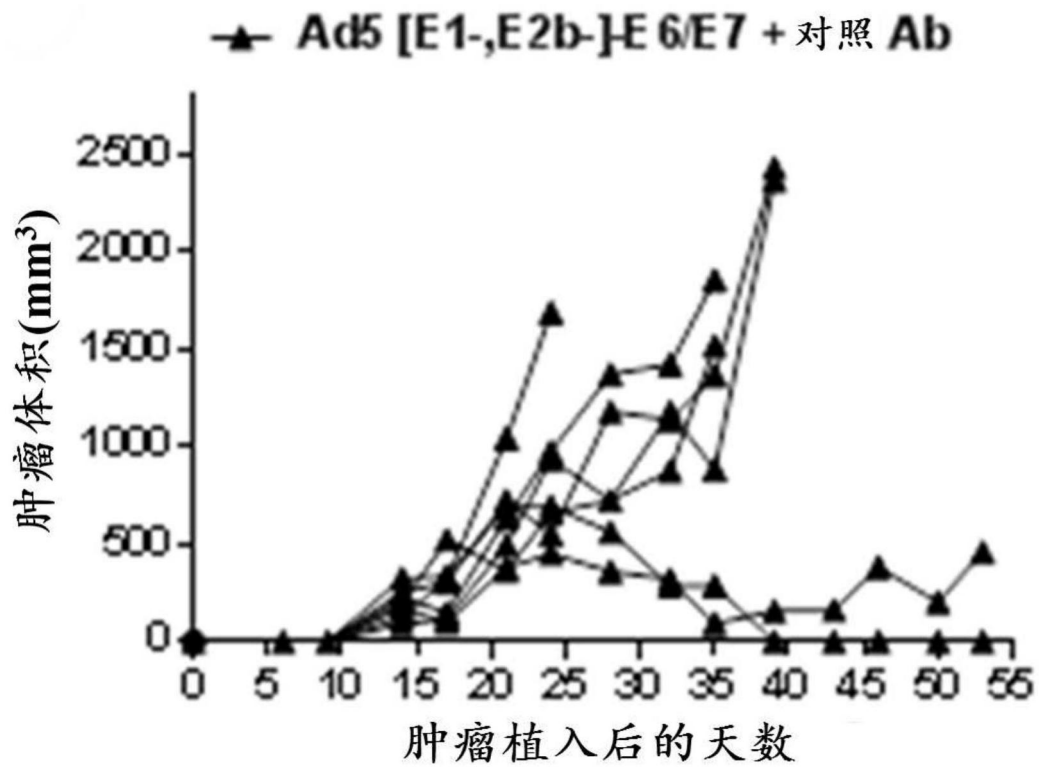


图41C

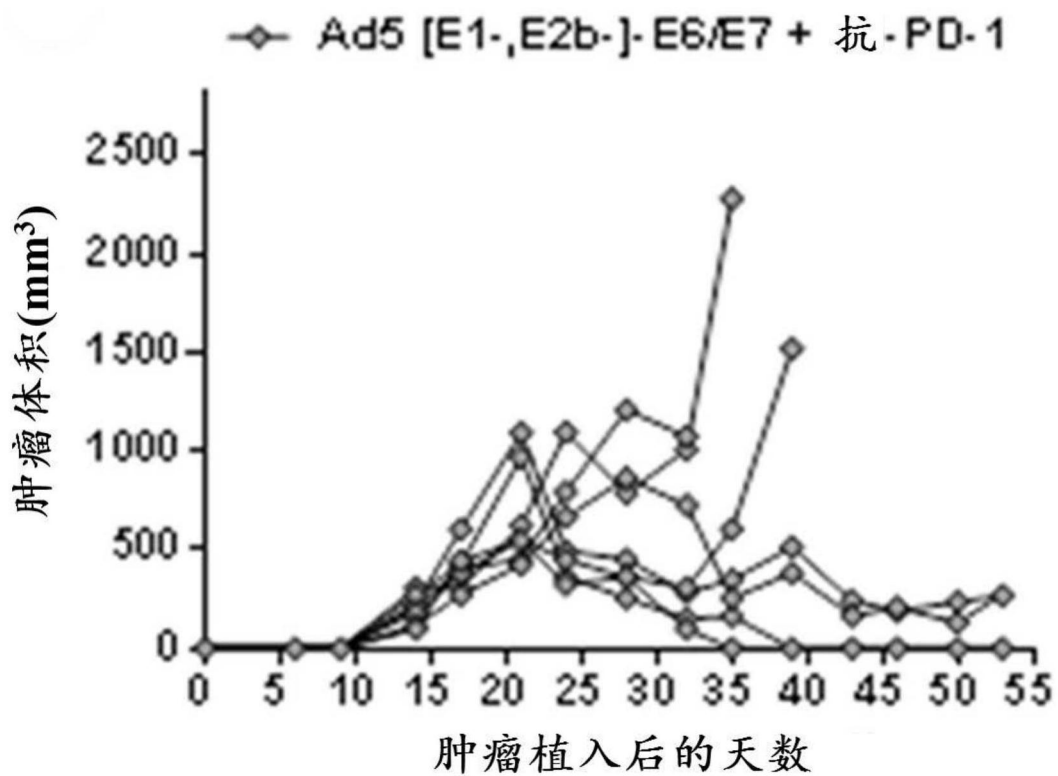


图41D

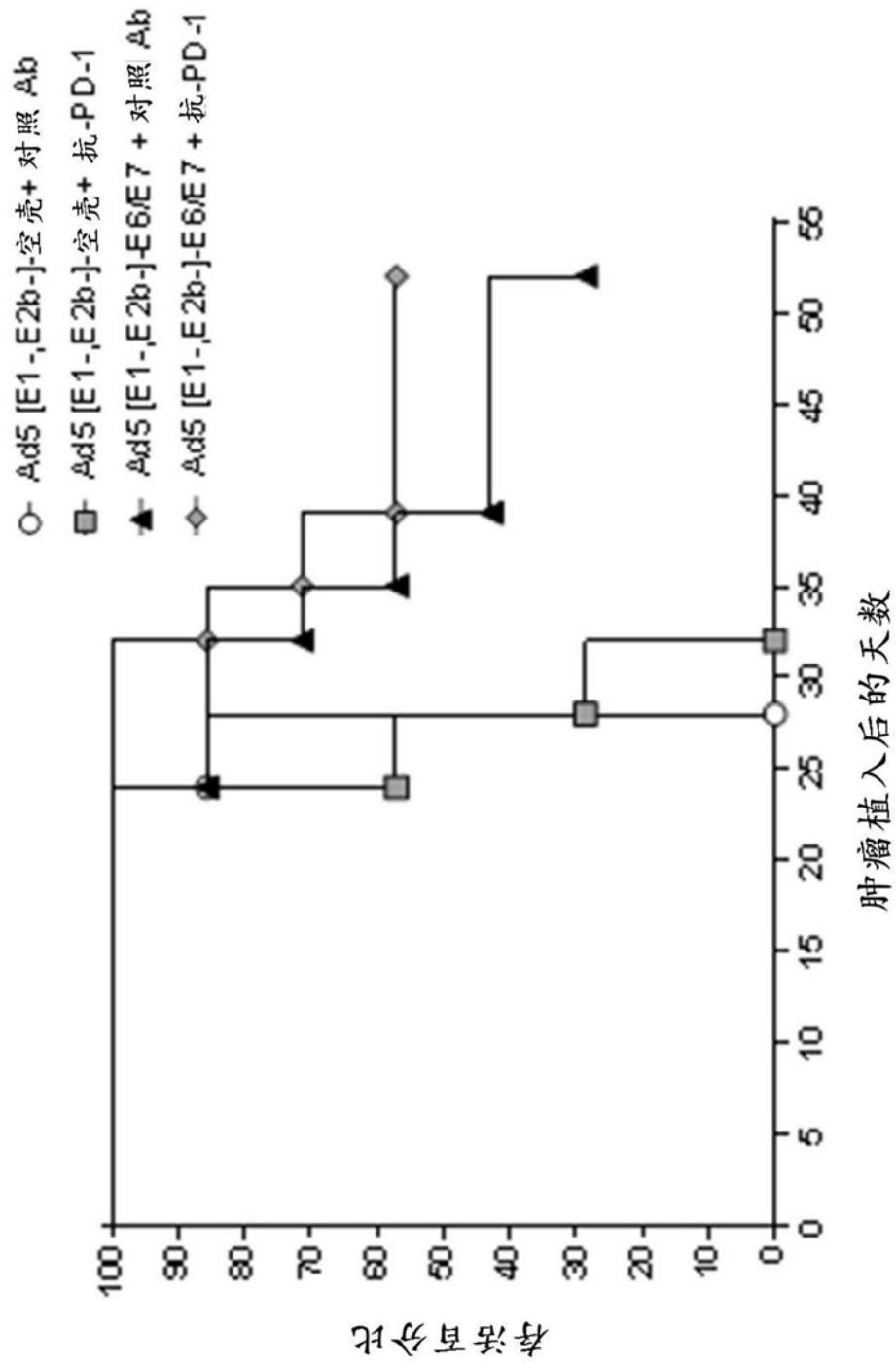


图42

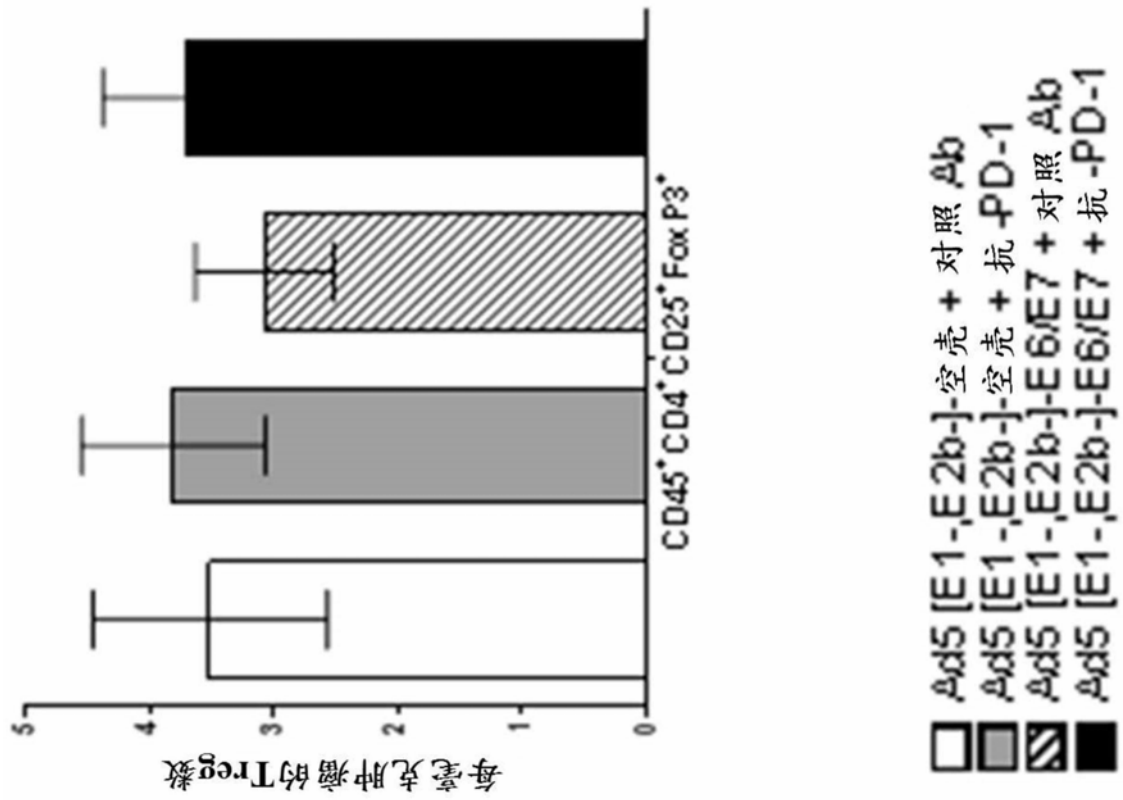


图 43B

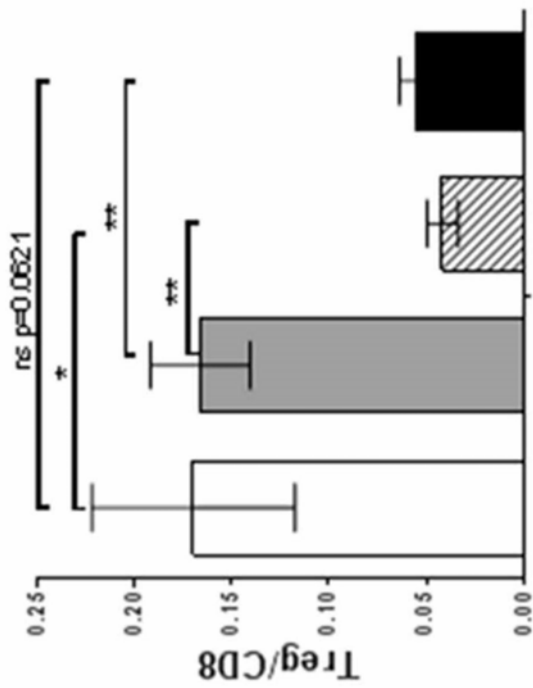


图 43A

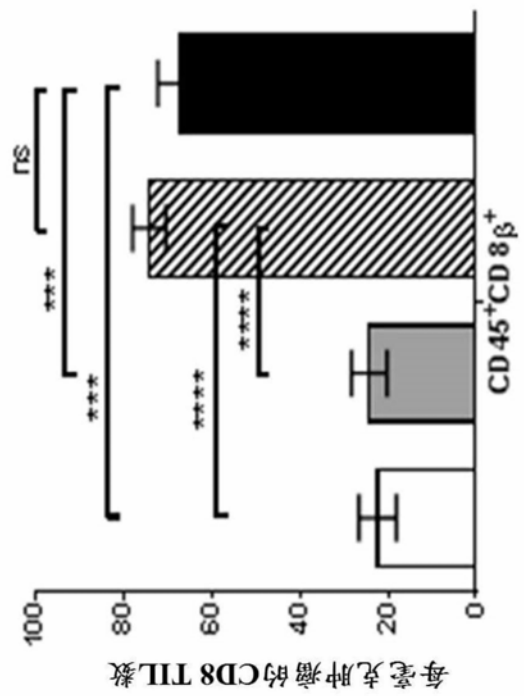


图 43C

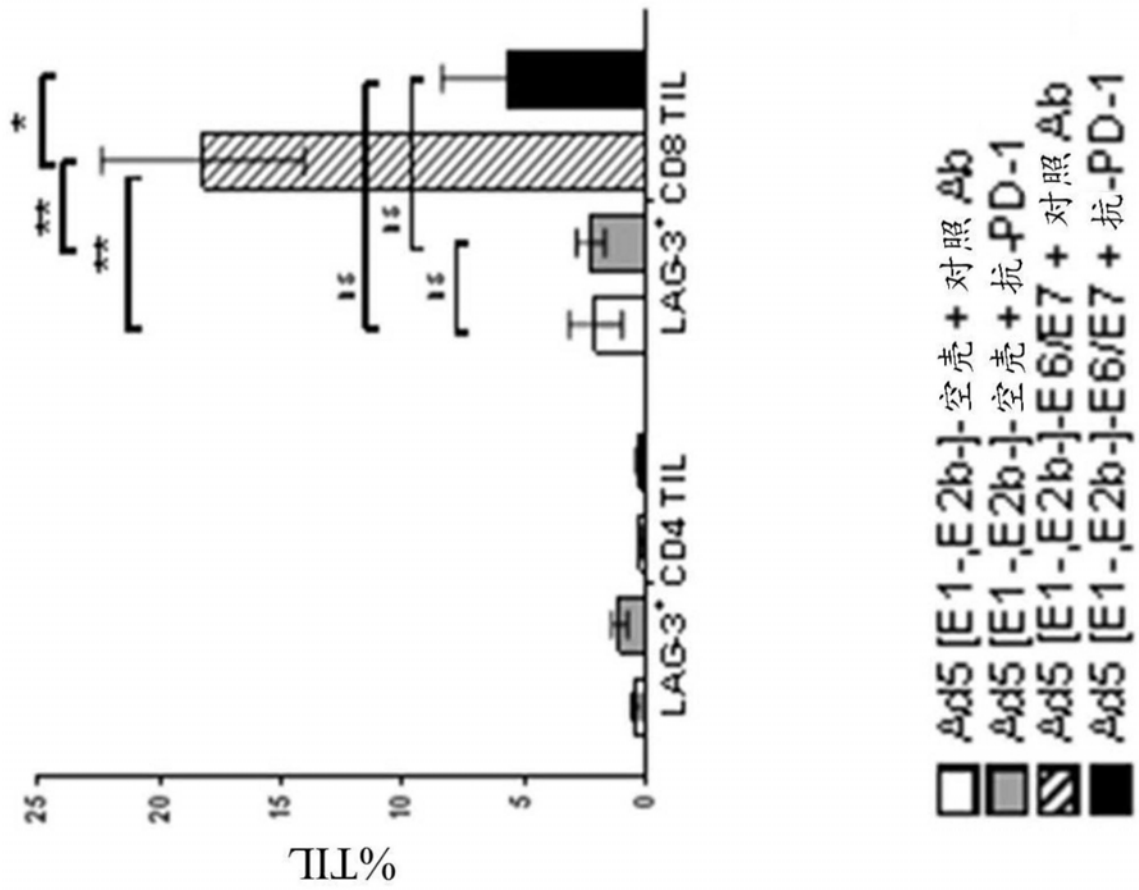


图 44B

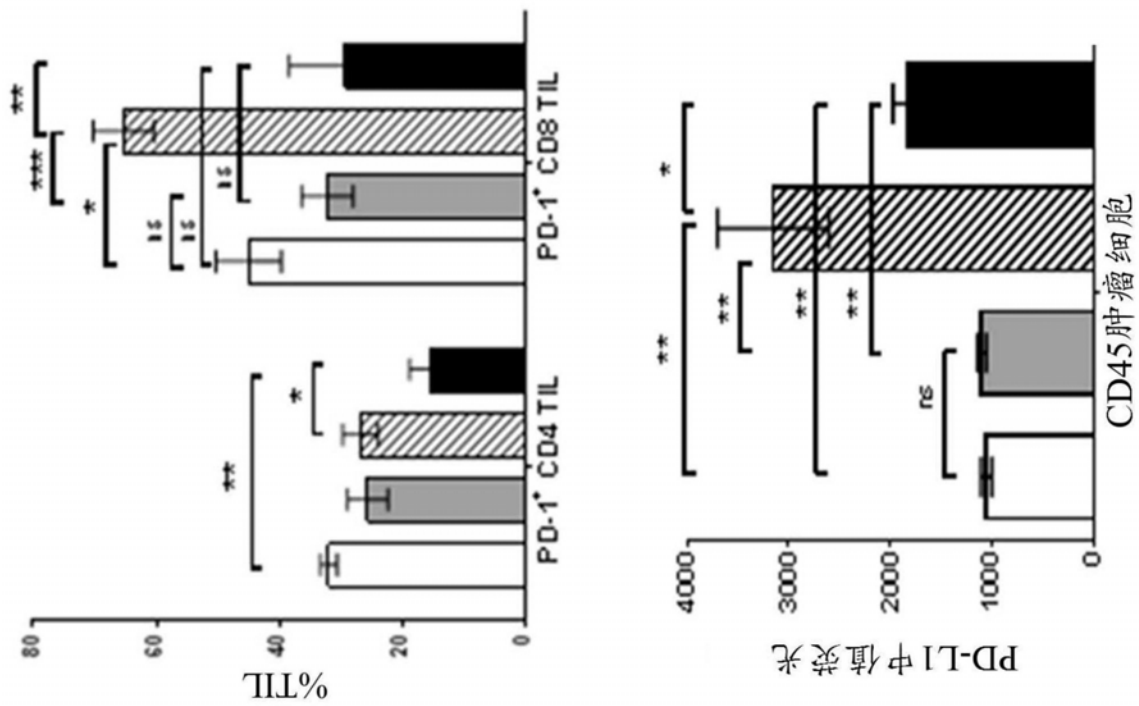


图 44A

图 44C